

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2000-508922

(P2000-508922A)

(43) 公表日 平成12年7月18日 (2000.7.18)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 5/06		C 1 2 N 5/00	E
A 6 1 F 2/10		A 6 1 F 2/10	
A 6 1 L 27/00		A 6 1 L 27/00	C

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 63 頁)

(21) 出願番号	特願平9-539001	(71) 出願人	ケース ウェスタン リザーブ ユニバーシティ アメリカ合衆国, 44106-7080 オハイオ, クリーブランド, ユークリッド アベニュー 10900
(86) (22) 出願日	平成9年4月24日 (1997.4.24)	(72) 発明者	ソレル, ジェイ., マイケル アメリカ合衆国, 44118 オハイオ, クリーブランド ハイッツ, サウス テイラーロード 2620
(85) 翻訳文提出日	平成10年10月26日 (1998.10.26)	(72) 発明者	キャプラン, アーノルド, アイ. アメリカ合衆国, 44121 オハイオ, クリーブランド ハイッツ, オークリッジ ドライブ 1300
(86) 国際出願番号	P C T / U S 9 7 / 0 6 7 6 0	(74) 代理人	弁理士 丹羽 宏之
(87) 国際公開番号	W O 9 7 / 4 1 2 0 8		
(87) 国際公開日	平成9年11月6日 (1997.11.6)		
(31) 優先権主張番号	6 0 / 0 1 6 , 3 1 7		
(32) 優先日	平成8年4月26日 (1996.4.26)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, CA, JP, US		

(54) 【発明の名称】 間葉幹細胞を用いる皮膚再生

(57) 【要約】

開示されるのは、(i) 真皮形成細胞をとり込まれた足場層、および (ii) ケラチノサイトを持つ多層皮膚等価物である。更に開示されるのは、(i) 乳頭真皮線維芽細胞を含む少くとも1個の皮膚関連細胞外基質成分の第一層、およびそれと層状の関係で (ii) 細網真皮芽細胞を含む少くとも1個の皮膚関連細胞外基質成分の第二層、の少くとも1個を持つ多層真皮等価物である。望ましい実施例は、足場すなわち真皮形成層が (a) 分離乳頭真皮形成細胞を含む層および分離細網真皮形成細胞を含む層、(b) 分離乳頭真皮形成細胞を含む層および分離培養拡張間葉幹細胞を含む層、および (c) 分離細網真皮形成細胞を含む層および分離培養拡張間葉幹細胞を含む層、よりなるグループから選択される多層であるものを含む。更に含まれるのは、(i) 乳頭真皮線維芽細胞を含む少くとも1個の皮膚関連細胞外基質成分の第一層、およびそれと層状に関係して、細網真皮線維芽細胞を含む少くとも1個の皮膚関連細胞外基質成分の第二層を含む足場層、および (ii) ケラチノサイト層、を持つ多層皮膚等価物である。更に開示されるのは、薬理許容

注射可能担体内で真皮形成細胞および少くとも1個の皮膚関連細胞外基質成分の注射可能組成物である。注射可能組成物は更にケラチノサイトを含むことができる。

【特許請求の範囲】

1. (i) 真皮形成細胞をとり込む足場層、および
(i i) ケラチノサイト層
を含む一つの多層皮膚等価物。
2. 請求の範囲第1項記載の多層皮膚等価物であってここで真皮形成細胞が自己由来であることを特徴とする多層皮膚等価物。
3. 請求の範囲第1項記載の多層皮膚等価物であって、ここで真皮形成細胞がヒト間葉幹細胞であることを特徴とする多層皮膚等価物。
4. 請求の範囲第1項記載の多層皮膚等価物であって、ここで真皮形成細胞が真皮線維芽細胞であることを特徴とする多層皮膚等価物。
5. 請求の範囲第1項記載の多層皮膚等価物であって、ここで真皮形成細胞がヒト間葉幹細胞と真皮線維芽細胞の組合せであることを特徴とする多層皮膚等価物。
6. 請求の範囲第1項記載の多層皮膚等価物であって、ここで足場層が少なくとも1個の皮膚関連細胞外基質成分を含むことを特徴とする多層皮膚等価物。
7. 請求の範囲第6項記載の多層皮膚等価物であって、ここで皮膚関連性細胞外基質成分がコラーゲン、エラスチン、ICAM_s、NCAM、ラミニン、ヘパリン結合成長因子、フィブロネクチン、プロテオグリカン(HSPG、CSPG)、テナスチン、E-カドヘリンおよびフィブリリンよりなるグループから選択されることを特徴とする多層皮膚等価物。
8. 請求の範囲第1項記載の多層皮膚等価物であって、ここで前記層の少なくとも1個が試験管内あるいは生体内のいずれかで真皮成分への間葉幹細胞の増殖、委託あるいは分化を高める生物活性因子を更に含むことを特徴とする多層皮膚等価物。
9. 請求の範囲第1項記載の多層皮膚等価物であって、ここで前記層の少なくとも1個が真皮皮膚等価物の付着あるいは血管形成を促進する少なくとも1個の薬剤を更に含むことを特徴とする多層皮膚等価物。
10. 請求の範囲第1項記載の多層皮膚等価物であって、ここで真皮形成細胞が

多層皮膚等価物で治療される個体からのものであることを特徴とする多層皮膚等価物。

1 1 . 請求の範囲第 1 項記載の多層皮膚等価物であって、ここでケラチノサイトが多層皮膚等価物で治療される個体からのものであることを特徴とする多層皮膚等価物。

1 2 . 請求の範囲第 1 項記載の多層皮膚等価物であって、ここで真皮形成細胞が増殖されることを特徴とする多層皮膚等価物。

1 3 . 請求の範囲第 1 0 項記載の多層皮膚等価物であって、ここで真皮形成細胞が間葉幹細胞であることを特徴とする多層皮膚等価物。

1 4 . 請求の範囲第 1 項記載の多層皮膚等価物であって、ここでケラチノサイトが足場層で増殖されることを特徴とする多層皮膚等価物。

1 5 . 請求の範囲第 1 項記載の多層皮膚等価物であって、ここでケラチノサイトがラインバルド・グリーン培地にある足場層

で増殖されることを特徴とする多層皮膚等価物。

1 6 . 請求の範囲第 1 項記載の多層皮膚等価物であって、ここで真皮形成細胞が間葉幹細胞であり、それが生物活性真皮系列誘導因子で前処理されておりその結果真皮線維芽細胞が足場で増殖あるいは更に分化されることを特徴とする多層皮膚等価物。

1 7 . (i) 乳頭真皮形成細胞を含む少くとも 1 個の皮膚関連細胞外基質成分の層、および

(i i) 細網真皮形成細胞を含む少くとも 1 個の皮膚関連細胞外基質成分の層、
よりなるグループから選択される少くとも 1 個の真皮形成層を含む一つが多層真皮等価物。

1 8 . 請求の範囲第 1 7 項記載の真皮等価物であって、ここでいずれかの層の真皮形成層が (a) 間葉幹細胞と細網線維芽細胞の組合せおよび (b) 間葉幹細胞と乳頭線維芽細胞の組合せおよび (c) いずれかの層が間葉幹細胞、細網線維芽細胞および乳頭線維芽細胞のどれか一つであるものよりなるグループから選択さ

れることを特徴とする真皮等価物。

19. 請求の範囲第17項記載の真皮等価物であって、

(i) 分離乳頭真皮形成細胞を含む少くとも1個の皮膚関連細胞外基質成分の層、および、それと層状関係で、

(i i) 分離細網真皮形成細胞を含む少くとも1個の皮膚関連細胞外基質成分の層

を含むことを特徴とする真皮等価物。

20. 請求の範囲第17項記載の真皮等価物であって、

(i) 分離乳頭真皮形成細胞を含む少くとも1個の皮膚関連細胞外基質成分の層、および、それと層状関係で、

(i i) 分離培養拡張間葉幹細胞を含む少くとも1個の皮膚関連細胞外基質成分の層

を含むことを特徴とする真皮等価物。

21. 請求の範囲第17項記載の真皮等価物であって、

(i) 分離細網真皮形成細胞を含む少くとも1個の皮膚関連細胞外基質成分の層、および、それと層状関係で、

(i i) 分離培養拡張間葉幹細胞を含む少くとも1個の皮膚関連細胞外基質成分の層

を含むことを特徴とする真皮等価物。

22. 請求の範囲第17項記載の真皮等価物であって、ここで第一層および第二層の皮膚関連細胞外基質成分が、コラーゲン、エラスチン、ICAM₂、NCAM、ラミニン、フィブロネクチン、プロテオグリカン(HSPG、CSPG)、テナスチン、ヘパリン結合成長因子、E-カドヘリン、およびフィブリリンよりなるグループから個別に選択されることを特徴とする真皮等価物。

23. 請求の範囲第18項記載の真皮等価物であって、ここで第一層および第二層の皮膚関連細胞外基質成分が、コラーゲン、エラスチン、ICAM₂、NCAM、ラミニン、フィブロネクチン、プロテオグリカン(HSPG、CSPG)、テナスチン、ヘパリン結合成長因子、E-カドヘリン、およびフィブリリンより

なるグループから個別に選択されることを特徴とする真皮等価物。

24. 請求の範囲第19項記載の真皮等価物であって、ここで第一層および第二層の皮膚関連細胞外基質成分が、コラーゲン、エラスチン、ICAM、NCAM、ラミニン、フィブロネクチン、プロテオグリカン(HSPG、CSPG)、テナスチン、ヘパリン結合成長因子、E-カドヘリン、およびフィブリリンよりなるグループから個別に選択されることを特徴とする真皮等価物。

25. 請求の範囲第20項記載の真皮等価物であって、ここで第一層および第二層の皮膚関連細胞外基質成分が、コラーゲン、エラスチン、ICAM、NCAM、ラミニン、フィブロネクチン、プロテオグリカン(HSPG、CSPG)、テナスチン、ヘパリン結合成長因子、E-カドヘリン、およびフィブリリンよりなるグループから個別に選択されることを特徴とする真皮等価物。

26. 請求の範囲第17項記載の多層皮膚等価物であって、ここで前記層の少なくとも1個が試験管内あるいは生体内のいずれかで真皮成分への間葉幹細胞の増殖、委託あるいは分化を高める生物活性因子を更に含むことを特徴とする多層皮膚等価物。

27. 請求の範囲第17項記載の多層皮膚等価物であって、ここで前記層の少なくとも1個が真皮皮膚等価物の付着あるいは血管形成を促進する少なくとも1個の薬剤を更に含むことを特徴とする多層皮膚等価物。

28. 請求の範囲第17項記載の真皮等価物であって、ここで乳頭および細網真皮形成細胞が真皮線維芽細胞であることを特徴とする真皮等価物。

29. 請求の範囲第17項記載の真皮等価物であって、ここで乳頭および細網真皮形成細胞が同じ個体からのものであることを特徴とする真皮等価物。

30. 請求の範囲第29項記載の真皮等価物であって、ここで乳頭および細網線維芽細胞が多層真皮等価物を投与されるべき個体からのものであることを特徴とする真皮等価物。

31. 一つの多層皮膚等価物であって、

(i) (a) 乳頭真皮形成細胞を含む少なくとも1個の皮膚関連細胞外基質成分

の層、(b) 細網真皮形成細胞を含む少くとも1個の皮膚関連細胞外基質成分の層、(c) 分離培養拡張間葉幹細胞を含む少くとも1個の皮膚関連細胞外基質成分の層を含み、更に、

(ii) ケラチノサイト層

を含むことを特徴とする多層皮膚等価物。

32. 請求の範囲第31項記載の皮膚等価物であって、ここで真皮形成層が

(i) 分離乳頭真皮形成細胞を含む少くとも1個の皮膚関連細胞外基質成分の層、および、それと層状関係で、

(ii) 分離細網真皮形成細胞を含む少くとも1個の皮膚関連細胞外基質成分の層

を含むことを特徴とする皮膚等価物。

33. 請求の範囲第31項記載の皮膚等価物であって、ここで真皮形成層が

(i) 分離乳頭真皮形成細胞を含む少くとも1個の皮膚関連細胞外基質成分の層、および、それと層状関係で、

(ii) 分離培養拡張間葉幹細胞を含む少くとも1個の皮膚関連細胞外基質成分の層

を含むことを特徴とする皮膚等価物。

34. 請求の範囲第31項記載の皮膚等価物であって、ここで真皮形成層が

(i) 分離細網真皮形成細胞を含む少くとも1個の皮膚関連細胞外基質成分の層、および、それと層状関係で、

(ii) 分離培養拡張間葉幹細胞を含む少くとも1個の皮膚関連細胞外基質成分の層

を含むことを特徴とする皮膚等価物。

35. 請求の範囲第31項記載の皮膚等価物であって、ここで第一層および第二層の皮膚関連細胞外基質成分が、コラーゲン、エラスチン、ICAM_s、NCAM、ラミニン、フィブロネクチン、プロテオグリカン(HSPG、CSPG)、テナスチン、ヘパリン結合成長因子、E-カドヘリン、およびフィブリリンよりなるグループから個別に選択されることを特徴とする皮膚等価物。

36. 請求の範囲第32項記載の皮膚等価物であって、ここで第一層および第二層の皮膚関連細胞外基質成分が、コラーゲン、エラスチン、ICAMs、NCAM、ラミニン、フィブロネクチン、プロテオグリカン（HSPG、CSPG）、テナスチン、ヘパリン結合成長因子、E-カドヘリン、およびフィブリリンよりなるグループから個別に選択されることを特徴とする皮膚等価物。

37. 請求の範囲第33項記載の皮膚等価物であって、ここで

第一層および第二層の皮膚関連細胞外基質成分が、コラーゲン、エラスチン、ICAMs、NCAM、ラミニン、フィブロネクチン、プロテオグリカン（HSPG、CSPG）、テナスチン、ヘパリン結合成長因子、E-カドヘリン、およびフィブリリンよりなるグループから個別に選択されることを特徴とする皮膚等価物。

38. 請求の範囲第34項記載の皮膚等価物であって、ここで第一層および第二層の皮膚関連細胞外基質成分が、コラーゲン、エラスチン、ICAM、NCAM、ラミニン、フィブロネクチン、プロテオグリカン（HSPG、CSPG）、テナスチン、ヘパリン結合成長因子、E-カドヘリン、およびフィブリリンよりなるグループから個別に選択されることを特徴とする皮膚等価物。

39. 請求の範囲第31項記載の多層皮膚等価物であって、ここで前記層の少なくとも1個が試験管内あるいは生体内のいずれかで真皮成分への間葉幹細胞の増殖、委託あるいは分化を高める生物活性因子を更に含むことを特徴とする多層皮膚等価物。

40. 請求の範囲第31項記載の多層皮膚等価物であって、ここで前記層の少なくとも1個が真皮皮膚等価物の付着あるいは血管形成を促進する少なくとも1個の薬剤を更に含むことを特徴とする多層皮膚等価物。

41. 請求の範囲第31項記載の皮膚等価物であって、ここで乳頭および細網線維芽細胞が同じ個体からのものであることを特徴とする皮膚等価物。

42. 請求の範囲第41項記載の皮膚等価物であって、ここで

乳頭および細網線維芽細胞が多層皮膚等価物を投与されるべき個体からのもので

あることを特徴とする皮膚等価物。

43. 薬理許容注射可能担体内で真皮形成細胞および少なくとも1個の皮膚関連細胞外基質成分を含む一つの注射可能組成物。

44. 請求の範囲第43項記載の組成物であって、ここで真皮形成細胞が分離培養拡張間葉幹細胞、真皮線維芽細胞およびそれらの組合せよりなるグループから選択されることを特徴とする組成物。

45. 請求の範囲第44項記載の組成物であって、ここで真皮線維芽細胞が乳頭真皮線維芽細胞、細網真皮線維芽細胞およびそれらの組合せよりなるグループから選択されることを特徴とする組成物。

46. 請求の範囲第43項記載の組成物であって、ここで真皮形成細胞がヒトのものであることを特徴とする組成物。

47. 請求の範囲第46項記載の組成物であって、ここで乳頭および細網線維芽細胞が同じ個体からのものであることを特徴とする組成物。

48. 請求の範囲第47項記載の組成物であって、ここで乳頭および細網線維芽細胞が多層真皮等価物を投与されるべき個体からのものであることを特徴とする組成物。

49. 請求の範囲第43項記載の組成物であって、ここで少なくとも1個の皮膚関連細胞外基質成分がコラーゲン、エラスチン、I-CAM、N-CAM、ラミニン、フィブロネクチン、プロテオグリカン(HSPG、CSPG)、テナスチン、E-カドヘリン、およびフィブリリンよりなるグループから個

別に選択されることを特徴とする組成物。

50. 請求の範囲第43項記載の組成物であって、それが更にケラチノサイトを含むことを特徴とする組成物。

51. 請求の範囲第43項記載の注射可能組成物であって、それが試験管内あるいは生体内のいずれかで真皮成分への間葉幹細胞の増殖、委託あるいは分化を高める生物活性因子を更に含むことを特徴とする注射可能組成物。

52. 請求の範囲第43項記載の注射可能組成物であって、それが真皮皮膚等価物の付着あるいは血管形成を促進する少なくとも1個の薬剤を更に含むことを特徴

とする注射可能組成物。

【発明の詳細な説明】

間葉幹細胞を用いる皮膚再生

成人の皮膚は主としてケラチノサイトにより生成された表皮〔１〕および血管系、毛包、および他の副構造で変化を与えられた間葉源の線維芽細胞により形成された複合真皮〔２〕よりなる。真皮内には組織学的に異なった領域、つまり表皮基底膜のすぐ下の真皮乳頭層、および筋および脂肪を含む皮下組織区に深く拡張する細網真皮層がある。真皮線維芽細胞への正式な系列地図は存在しない。培養される真皮細胞の型は推敲された形態学および生化学規準により記述されてきた〔３〕が、間葉真皮始原細胞から細網乳頭および小胞真皮細胞への系列進行は理解されていない。

真皮線維芽細胞の中で、間葉幹細胞（MSC）の限定された母集団〔４〕が骨髓間質の多能性着性細胞〔５〕として初めて確認されたように見える。成人にあるMSCは骨、軟骨、筋、腱、靱帯、脂肪細胞、結合組織、および真皮を含むいろいろな間葉表現型に使用できる細胞である。ケース・ウエスタン・リザーブ・ユニバーシティのフレミング他〔４〕は、真皮に備わる線維芽細胞の小副次集団が骨髓のMSCを特異的に標識する試薬であるモノクローナル抗体SH2と反応する〔６〕ことを論証した。MSCは血管系、毛包に集まり、表皮基底膜に隣接するがこの局在化のパターンの重要性はまだ決定されていない。興味深いことに、フレミングおよび協力者〔４〕は更にSH2反応性に基づく真皮にあるMSCの数が

患者の年齢と共に20歳以上は検出できないレベルまで減少することを示唆する。この観察は皮膚の老化およびその自己再生能についての我々の理解に貢献する。

ヒト皮膚の胎生発育については、ホルブルックおよび協力者〔２、７〕が血管系および付加物要素に焦点をあてて一連の層外観を記述しているけれども、相対的には殆ど知られていない。細胞外基質分子、細胞表面タンパク質、および成長因子への標識が発育中の皮膚の層を特徴付けるのに役立つように使用されてきたが、試験管内分化のためのモデル系が欠乏しているためにこの分野での進歩を妨

げた。皮膚器官培養〔7〕あるいは胚側球体は胚発育を研究するために報告された最良のシステムである。これらの培養物は懸濁培養液に導入された全層側面のパッチよりなり、ここでこれは球体を形成するために円形化される。これらの培養は外側に表皮、内側に真皮を持ち、それは相対的に正常な発育事象の配列を通じて進行する。これらの身体の構造の故で、真皮細胞の系列進行を明確に確立する球体を使用することは難しい。

ここ数年に生体皮膚等価物〔1〕が確立され、自己由来あるいは同種異系ケラチノサイトから表皮層を再構築する技術が大きく進歩した。ケラチノサイト培養物の供給層は、一般には副次培養に適した構成にある線維芽細胞である。一方でこれらの皮膚等価物は移植片で機能できるが、線維芽細胞供給層は真の多層真皮とは同じではない。

皮膚修復および再生法と産物を主として必要とするのは重い熱傷および皮膚潰瘍である。一方で改良された治療に対する大

きな需要があるが市場においてあるいは臨床展開においても完全に満足な産物は存在しない。合衆国における必要性の範囲は以下のとおり推定される。

損傷の型

合衆国推定患者人口

部分厚熱傷	2, 000, 000
入院熱傷患者	100, 000
皮膚移植を要する熱傷	70, 000
実施された皮膚移植	150, 000
(患者当り多部位を反映)	
圧迫性(褥瘡)潰瘍	1, 500, 000
静脈潰瘍	500, 000
糖尿病性潰瘍	600, 000
モーズ手術性損傷	100, 000

部分厚熱傷は、熱傷が皮膚の表面層(表皮層)を含み、下層真皮層に入りしかしそれを貫通はしないものを構成する。これら損傷の殆どは移植あるいは他の組織置換なしで処置される。この保守的なアプローチで有効なのは、表皮層の修復

を必要とするケラチノサイト（表皮層の一次細胞型）が真皮、とりわけ毛包および脂腺を取り巻く組織に存在するためである。

より広範な熱傷を持つ患者は一般に自然治癒では適切に処置することができないが、それは（１）これらの熱傷がケラチノサイトの源を提供する下部の真皮層をしばしば破壊し、（２）全厚創傷の治癒は縁から生じ、それは保護されない組織を通じて高い感染の危険性に患者をさらす長い過程であり、また（３）自然治癒はいずれも美容上魅力的でなく柔軟性に欠け動

きの範囲に起因して物理的に拘束性となり得る重大な瘢痕輪および皮膚収縮に導くからである。

重い熱傷は間葉幹細胞治療の主な適用となるが、何故ならそれは重大な医学的脅威を表し、それがコストの高い治療を生み出し、またそれが長期の回復期間を必要とするためである。重い熱傷は特殊な熱傷ユニットを持つ病院に、あるいは重症の場合には主要熱傷センターに差し向けられる。

褥瘡（圧迫性）潰瘍は寝たきり患者を扱う養護施設および病院での治療と関連する継続する問題の一つである。これは皮膚への血液循環を制限する局所限定圧迫のために生じる。潰瘍は区域できわめて大きく真皮層の全層に貫入することがある。それは治癒が難しくかなりの保護手段を必要とする。

静脈潰瘍はとりわけ下肢に老化と関連して乏しい循環から生じる。年齢で劣化した血管は血液の心臓への移動を維持する「バルブ」機能を失わせることができる。これが起こると、四肢に血液の貯留が生じ毒素の除去を無効にする。これは影響を受けた血管で供給される皮膚細胞の劣化を生じる。

糖尿病潰瘍は類似の過程を通じて生じる。糖尿病は進行性糖化最終生成物（タンパク質と結合する過剰糖分）および多分ソルビトールの累積を通じて動脈の劣化を起こす。これら動脈が劣化するにつれて、それは皮膚細胞を適切に供給できず細胞死滅に導かれる。血行静止場合のように、注入治癒を得るための補正を必要とする内在する循環欠損が存在する。しかしたとえ欠損が修復されたとしても適切に治癒されない限り潰瘍は持続することになる。

皮膚置換は真皮潰瘍を治療するための理想的産物である。内在する欠損がしばしば治癒されずまた、潰瘍が事例の20-50%で再発するために繰返し適用されることが必要となる。

皮膚癌の切除と関連する手術創傷は間葉幹細胞皮膚再生のためのものの主要な適用を表す。手術創傷はしばしば深くまた美容上外観を損う。治癒を加速し瘢痕を最小にする（顔面および頸部には皮膚癌病変の不均合な発生率がある）治療は重要な必要性を示している。

現在市場にある皮膚置換産物の数は限定されており、発展中のこれらのものはいずれもとりわけ完全あるいは部分的厚さの産物として臨床的必要性に完全に合致していないように見える。皮膚置換に臨床的に成功する手段は（1）広い範囲の真皮損傷を治療する能力、（2）表皮層および真皮皮膚層の両方を置換しあるいは再生する能力、（3）内在組織による高い度合いでの「取り入れ」あるいは受け取りおよび成長、（4）自然治癒過程の短縮、および（5）最小の瘢痕を含む。

現在の産物が治癒期間を短縮する証拠は殆どない。従って臨床結果を改善し回復も加速する治療アプローチに関する市場を実質的に拡張するための可能性が存在する。

真の多層皮膚等価物はこれまで可能ではなかったが、それは現存する皮膚等価物が加工同種移植片組織あるいは自家移植片皮膚などのようにケラチノサイトとして「代理基質」を使用し、そのような代理はすべて完全な組織形態形成能力を欠いているためである。

更に採取皮膚からの自家移植片を用いる真皮置換の魅力を弱める非常に重大な欠点は、長い回復期間を必要とし、真皮関門の更なる分裂を通じて増大する感染の危険性を患者にさらした並み外れて痛みを伴うかなりの手術損傷を創り出す困った事態が存在することである。

発明の要約

間葉幹細胞（MSC）の使用は、初めて自己由来真皮再生産物の発展を可能にする。この発明の皮膚修復産物は、自己由来MSC誘導皮膚芽細胞および培養

ヒトケラチノサイトを含みかくして自己由来あるいは自己由来および同種異系細胞組合せ産物よりなる真の形態形成多層皮膚等価物を提供する。これは治癒を加速し非アレルギー性様式で瘢痕を減少する全層真皮再生を提供する。

一つの見地において、この発明は、(i) 真皮形成細胞を組み込まれた足場層、および(ii) ケラチノサイト層を持つ多層皮膚等価物を提供する。真皮形成細胞は望ましくは自己由来であり、またヒト間葉幹細胞、真皮線維芽細胞（例えば乳頭あるいは細網真皮線維芽細胞）あるいはそれらの混合物であり得る。足場は望ましくはタイプ I コラーゲンのみあるいはタイプ I およびタイプ III コラーゲンの組合せである。真皮形成細胞が多層皮膚等価物で治療される個体から誘導されることも望ましい。望ましくは、ケラチノサイトもまた自己由来のものである。

も一つの見地において、この発明は、(i) 乳頭真皮線維芽細胞を含む少くとも 1 個の皮膚関連細胞外基質成分の一つの

層、および(ii) 細網真皮線維芽細胞を含む少くとも 1 個の皮膚関連細胞外基質成分の第 2 の層、よりなるグループから選択される少くとも 1 個の真皮形成層を含む多層真皮等価物を提供する。この見地の望ましい実施例は、足場もしくは真皮形成層が(a) 分離乳頭真皮形成細胞を含む層および分離細網真皮形成細胞を含む層、(b) 分離乳頭真皮形成細胞を含む層および分離培養拡張間葉幹細胞を含む層、および(c) 分離細網真皮形成層を含む層および分離培養拡張間葉幹細胞を含む層、よりなるグループから選択される多層であるものを含む。乳頭および細網線維芽細胞は望ましくは同一個体からのものであり、これは望ましくは多層真皮等価物が投与される個体である。

間葉幹細胞を含む層と層状関係にある乳頭真皮線維芽細胞を含む皮膚関連細胞外基質成分の層を含む実施例において、産物は内在組織と接触する間葉幹細胞を含む層を持つ受容体の部位に配置される。間葉幹細胞を含む層と層状関係にある細網真皮線維芽細胞を含む皮膚関連細胞外基質成分の層を含む実施例においては、産物は内在組織と接触する細網線維芽細胞を含む層を持つ受容体の部位に配置される。

更にも一つの見地において、この発明は (i) 乳頭真皮線維芽細胞を含む少くとも1個の皮膚関連細胞外基質成分の第1層および、層状関係で、細網真皮線維芽細胞を含む少くとも1個の皮膚関連細胞外基質成分の第2の層を含む足場層、および (ii) ケラチノサイト層、を持つ多層皮膚等価物を提供する。真皮形成層のとりわけ望ましい実施例は前に記載のものと同一である。

更なる見地において、この発明は真皮形成細胞を含む注射可能組成物および薬理許容注射可能担体内での少くとも1個の皮膚関連細胞外基質成分を含む注射可能組成物を提供する。真皮形成細胞は、分離培養拡張間葉幹細胞、真皮線維芽細胞およびそれらの組合せであることができる。それらは望ましくはヒトのものであり、もっとも望ましくは自己由来のものである。真皮線維芽細胞は乳頭真皮線維芽細胞、細網真皮線維芽細胞あるいはその組合せであり得る。組成物は更にケラチノサイトを含むことができる。

ケラチノサイトおよびもしくは委託されたあるいは分化した皮膚芽細胞を持つMSC₀の存在を含むこれらの見地および実施例の順列は、各種細胞型を産物の製造の間に生体外で組合せることができるもの、あるいは1個もしくはそれ以上のそのような細胞型を、修復されるべき皮膚の区域にある位置にある間に産物にそのような細胞を加えることによりあるいは選択肢として生体内で全身あるいは局所に投与できることにより、真皮あるいは皮膚等価物産物の受容体に投与することができるものである。

hMSC₀の存在が減少するにつれて、真皮層を再生する皮膚の能力の著しい減退がやってくる。我々の目的は創傷床と接触する培養拡張自己由来hMSC₀の豊かな足場を提供することにより皮膚を再生する患者の能力を再確立することである。我々のアプローチは皮膚の正常な多層構造および皮膚代謝回転の正常な生理学を再生産する能力を提供する。豊富な真皮始原細胞の存在は連続した再移植片の必要を除去し、また材料が完

全に非外来源の細胞であることから、拒絶反応あるいは免疫応答の危険性はないであろう。

この発明のhMSC₃細胞治療は創傷医療のための最初の生体内皮膚始原産物を提供し、かくしてそれは最初の真皮再生産物となる。ヒトMSC真皮始原細胞は創傷あるいは潰瘍部位に直接注射され、足場で真皮皮膚等価物に形成され、あるいは最初の機能的多層皮膚等価物を創り出すためにケラチノサイトと組合せることができる。

非免疫性線維芽細胞あるいは死休組織とは異なり、自己由来hMSC₃は患者の自家移植片採取あるいは同種移植組織からの拒絶反応なしで局所生物活性因子（あるいは追加生物活性因子）の制御の下で新しい真皮を形成するであろう。これらの状況下では自己由来hMSC₃産物は皮膚自家移植片の治療成果を複製し、治癒を加速し、患者の真皮採取の必要を減少し、また入院時間と費用を大幅に節減する。

皮膚および真皮の再生ならびにこの発明の等価産物は分離培養拡張間葉幹細胞（hMSC₃）と組合せた皮膚関連細胞基質成分、例えばコラーゲン（望ましくはタイプIあるいはタイプIIIと組合せたタイプI）、修飾コラーゲンおよびもしくはエラスチン、ICAM₃、NCAM、ラミニン、フィブロネクチン、プロテオグリカン（HSPG、CSPG）、テナスチン、ヘパリン結合成長因子、E-カドヘリンおよびもしくはフィブリリンなどを含む。これらの間葉幹細胞は正常真皮を含む多重構造および結合組織を生み出す自然発生始原細胞である。コラーゲン基質のみから生産されあるいは非特異的線維芽細胞の

層で生産される皮膚等価物とは異なり、この発明の真皮再生産物は、熱傷、潰瘍形成を通じて変性し、あるいは急性損傷もしくは手術を通じて妨げた患者自身の真皮を再構築するための著しく多い真皮再生能を持つ。正常真皮を再構築する能力は、真皮成分を再生することが臨床的に有益である多層皮膚等価物あるいは他の産物の相対的配置で精製自己由来真皮始原細胞の細胞含有物によるものである。

皮膚および真皮再生ならびにこの発明の等価物は更に試験管内あるいは生体内での間葉幹細胞の真皮成分への増殖、委託あるいは分化を高める生物活性因子を含む。更にこの発明の産物は真皮皮膚等価物の付着あるいは血管形成を促進する

少なくとも 1 個の薬剤を含むことができる。

間葉幹細胞を得るためには、骨髓にある他の細胞あるいは他の MSC 源から希有多能性間葉幹細胞を分離する必要がある。典型的には、10-20 cc の吸引液が患者から採取されこれは 1,000-5,000 hMSCs を産出する。約 100-500 万培養拡張自己由来 hMSCs が次いで皮膚等価物の形で戻され、それは皮膚パッチあるいは創傷カバーとして適用される。骨髓あるいは分離間葉幹細胞は自己由来、同種異系で、あるいは異種源からのものであり、および胚あるいは生後源からのものであることができる。自己由来細胞の使用は望ましい。骨髓細胞は腸骨稜、大腿部、脛骨、脊椎、肋骨あるいは他の骨髓腔から得られる。ヒト間葉幹細胞の他の源は胚卵黄囊、胎盤、臍帯、骨膜、胎児および青年期の皮膚、他の軟組織および血液を含む。

この発明の皮膚等価物は、熱傷、潰瘍形成、擦過傷、裂傷損傷、あるいは手術創傷を通じて失われた真皮を再生するために使用されるよう指示される。それはまた部分から全層熱傷まで、各種の皮膚を冒す潰瘍を呈する患者を治療するため、および形成外科手術中に組織を再生するために適している。これらの皮膚等価物は自己由来 hMSCs を含み、皮膚形成性であり、そのようなものとして、それが 1 個もしくはそれ以上の真皮形成乳頭、乳頭小胞および細網真皮細胞に分化できる移植部位で直接真皮を再生する。この過程は再生真皮組織治療として知られる。

hMSCs の直接真皮形成活性は皮膚自家移植片あるいは他の真皮コラーゲン足場を採取するよりも優れており、それは hMSCs が真皮成長に含まれるものと形態形成（組織形成）事象を反復できるからである。採取された自家移植片あるいはコラーゲン基質は、間葉始原細胞（hMSCs）から周辺組織からあるいはこの課題を適当な期間に達成するために分化した十分な新しく形成された真皮細胞を強化することができない。

図面の簡単な説明

図 1. DiI と標識された乳頭真皮細胞および DiO と標識された細網真皮細胞と一緒に平板培養された。DiO 標識細胞（矢印）は場所（A）でフルオレセ

インフィルターで見た時可視であるが、場所 (B) でのローダミンフィルターでは可視ではない。D i I 標識細胞は両フィルターで可視である。倍率、 $380\times$; $1\text{ cm} = 26\text{ }\mu\text{ m}$

図 2 . 同一個体からの乳頭真皮線維芽細胞 (A) を細網真皮線維芽細胞と比較する成長曲線が、未標識細胞 (●) 、D i I 標識細胞 (▲) 、およびD i O 標識細胞 (■) 、±平均値の標準偏差を用いて示された。

図 3 . タイプ I コラーゲンゲルの収縮が同一個体からの乳頭真皮線維芽細胞 (A) と細網真皮線維芽細胞で比較された。35 mm ウェル当り500, 000個の細胞が未標識 (●) 、D i I 標識 (▲) 、あるいはD i O 標識 (■) 、±平均値の標準偏差で標識された。

図 4 . タイプ I コラーゲンゲルの収縮がD i I 標識乳頭真皮細胞のみ (●) 、D i O 標識細網真皮線維芽細胞のみ (▲) 、等数の無作為混合D i I 標識乳頭真皮細胞およびD i O 標識細網真皮細胞 (■) 、および等数のD i I 標識乳頭真皮細胞およびD i O 標識細網真皮細胞を含む二重層ゲル (□) で比較された。各35 mm ウェルは全体で250, 000 ±平均値の標準偏差を含んでいた。

図 5 . D i I 標識乳頭真皮細胞 (A) および細網真皮細胞 (B) が個別にタイプ I コラーゲンゲルに播種され14日間培養された。標識ゲルの断面は真皮細胞の両方の型がゲルの内側に存在し、ある細胞がゲル表面に移動 (矢じり) したことを明らかにする。倍率、 $155\times$; $1\text{ cm} = 65\text{ }\mu\text{ m}$ 。

図 6 . D i O 標識細網真皮がタイプ I コラーゲンゲルに播種され14日間培養された。ゲルの断面は図 5 で示されたものよりもより少ない細胞がゲル表面に移動 (矢じり) したことを明らかにする。倍率、 $155\times$; $1\text{ cm} = 65\text{ }\mu\text{ m}$ 。

図 7 . D i I 標識乳頭真皮細胞 (A) およびD i O 標識細網細胞 (B) が二重層ゲルを形成するためにタイプ I コラーゲンの個別の層に播種され28日間培養された。ゲルの断面はゲルの全層を提供するために重複分野で写真撮影された。パネル A で示される分野はローダミンフィルターを用いて撮影され、パネル B で示される分野はフルオレセインフィルターを用いて撮影された。ゲルの上面は矢

印で示され下面は矢じりで示される。D i I 標識の強度は図 1 で示されたものよりもかなり低かった。従って D i I 標識の細胞はフルオレセインフィルターで適所に見ることはできない。パネル A の乳頭細胞およびパネル B の細網細胞はそれぞれの層に留まることに注目しよう。ダッシュの線はゲルの上部および底部の間の境界を示している。倍率、 $130\times$; $1\text{ cm} = 77\text{ }\mu\text{m}$ 。

発明の詳細な説明

二重層および多層皮膚等価物は一般に置換皮膚の基質床あるいは枠組みへ移動する真皮形成細胞に依存する。このアプローチは「真皮伝導性」として引用され、ここでは置換皮膚基質は、局部真皮細胞が置換皮膚基質に移動することができ、新しい真皮層を形成し、一方皮膚置換基質は再吸収する足場を提供する。これは、広範な患者の医療を必要とし、治療過程を伸ばし、創傷部位で患者を感染されやすいままに留める病勢停止過程である。

これとは逆に、この発明のアプローチは「真皮形成性」として引用され、ここでは患者自身の真皮形成細胞が皮膚等価物の

コラーゲン足場に直接取り込まれる。患者自身の真皮始原細胞 (h M S C s) 数を増加しそれを (自家あるいは同種異系移植片ケラチノサイト層と共に) この発明の皮膚等価物に直接組み込むことにより、身体自身の自然修復メカニズムを用いて正常で完全機能性多層皮膚を回復することができる。

この発明の皮膚等価物は、正常組織の痛みを伴う患者の自家移植あるいは合成層もしくは患者の表皮層の多重置換の必要なしで正常な真皮および表皮皮膚層を再生する唯一のアプローチを含む。

間葉幹細胞は創傷部位の形状に合致する新しい真皮を再生する。周辺正常宿主組織に完全に組み込まれる新しい真皮が形成する。コラーゲン生物基質成分は最終的には再吸収される。皮膚等価物では真皮形成単位の密度は一定であるため、皮膚等価物の大きさに係りなく新しい真皮組織の同一の全割合を形成する。かなりの新しい全層皮膚が移植 8 - 10 週後に形成され、一方表皮および真皮改造過程が既に十分進行中である。その後著しい組織形態形成が起こり、ダーマージェン生物基質の僅かな痕跡が残り、新組織は周辺宿主組織に十分に組み込まれる。

移植改造過程で本来の真皮組織形成事象を反復することはこれまでの創傷部位での長期構造的完全性を確かにする。真皮始原細胞で出発することのみで、新しい真皮細胞成分、および細胞外基質分子の名目上の構造の形成を実施することができる。

皮膚等価物は望ましくは（培養拡張自己由来）hMSC_oを

含む。別のものはまたFDA承認製造実験記録を用いて無菌処理される培養拡張自己由来あるいは同種異系表皮細胞を含む。hMSC_oは続く外移植のための培養拡張ケラチノサイトを含むあるいは含まない（新鮮あるいは凍結）無菌パッチに取り込まれる。

いくつかの実施例は大きさおよび細胞組成物両方にわたる欠損状況に注意を向けるために熟考され設計され、また以下のものを含む：（１）コラーゲングル基質内のhMSC_o、（２）コラーゲングル基質内のhMSC_oプラス基質内培養拡張真皮細胞、（３）コラーゲングル基質内のhMSC_oプラス基質内培養拡張ケラチノサイト、および（４）創傷床、自家移植片、あるいは他の皮膚等価物への直接注射用懸濁hMSC_o。

皮膚等価物は足場材料および精製と拡張のために前に採取された患者自身の細胞（hMSC_o）を用いて調製される。採取3-4週後、患者の細胞は再生組織治療過程を開始するために使用される。

無菌産物を使用して、内側後腸骨稜からの骨髓吸引液が患者の枕元あるいは治療室手順で標準無菌技術により得られる。最小試料サイズの10-20ccが一次培養での適切なhMSC_o濃度を確保するために必要とされる。これは骨髓の濃縮化、試験管内増殖の開始あるいは培養拡張により獲得できる。

hMSC_oは年齢と共に減少するために、適切に開始する幹細胞濃度を得ることが重要である。有核細胞が骨髓から採取され続いて患者の希有間葉幹細胞の選択的付着を促進する無菌組

織培養条件の下で個別の分量（パッチ）で処理される。典型的には1,000万-5,000万個の有核骨髓細胞（年老いた患者の場合はこれよりも少ない）当

り僅か100-500個のhMSC₃が付着し組織培養で成長する。これは骨髓吸引液10cc当り約5,000個までのhMSC₃に転化する。細胞母集団の残りは各種の非粘着性造血細胞、間質細胞および他の粘着非MSC細胞を含んでおり、これらは細胞培養手順の初期に除去される。

付着骨髓誘導hMSC₃は均質の形態を示し、殆ど全てが線維芽細胞であり、まれには多角細胞である。粘着細胞は3日で個別細胞あるいはほんの僅かな細胞の小さいコロニーとして見られる。しかしそれは急速に複製し培養の第1週内で50-200細胞のコロニーを形成する。10-14日までに、間葉幹細胞のコロニーは数百個から数千個の細胞を含む各コロニーでそのサイズを拡張する。

未分化状態で間葉幹細胞を維持しその複製速度を制御するために、各一次hMSC培養は培養が~80-90%密集に達した時に新培養容器で継代培養される。新しい継代培養の細胞は、それが継代培養される時点で25-35%密集である細胞の均一分布層を形成するために付着する。細胞は分裂を続け、細胞密度が~80-90%密集に到達する時に再び継代され、T型フラスコ培養容器当り平均500万個の細胞を産出する。すべての調製品は胎仔ウシ血清、あるいは胎仔ウシ血清もしくは他の血清補足剤の追加を必要としない合成培地で培養拡張される。このような合成培地の一つは1995年6月5日受理さ

れた共通割当て出願中の合衆国連続番号08/464,599号に記載されている。

各培養容器からの細胞は細胞の骨軟骨形成能を失うことなく何回も繰返すことができる。従って100個から500個の粘着ヒト間葉幹細胞で開始した単一次培養は10億(1×10^9)個以上の細胞に拡張することができる。しかし典型的には小さな10-20cc骨髓吸引液は25個の一次培養容器で500万個までの細胞を提供し、従ってこの発明の大抵の皮膚等価物に対する十分な細胞は1-2継代で得ることができる。

すべての手順は治療創傷管理手順のための認定ガイドラインに従って標準無菌条件下で実行されねばならない。自己由来間葉幹細胞は無菌封入包み内の液状懸濁液で保持され、真皮再生手順の時点まで2℃および8℃(36°Fおよび46

。 F) の間で保持されるか、あるいは説明の前に2時間解凍されねばならない。患者の自己由来 h M S C₃ 手順のすべての見地は熱傷自家移植および創傷／裂傷管理のための認定規準に従って行われねばならない。

ヒト間葉幹細胞 (h M S C₃) は3種の領域で産物の活性治療成分として使用される。まず M S C₃ は、生体皮膚等価産物の生産中に試験管内表皮ケラチノサイト層の細胞支持系の一部として生産される。第二に M S C₃ は組織再生過程を援助する活性真皮形成成分として役立つ生体内多層皮膚等価物移植片の一部として使用される。第三に M S C₃ は細網真皮層の部分を再生するため、また潜在的には皮下層の筋組織の再生に寄与す

るために深い創傷で使用される。

この発明は M S C₃ () の真皮系列能の利点を利用して、第三世代多層形態形成皮膚等価物を創り出すのに有効な再生治療のための産物を提供する。重要な成分は M S C₃ の培養から出発する試験管内真皮線維芽細胞の発展である。特異型の真皮線維芽細胞の標識を認識するための学習および M S C₃ 分化の過程の制御は真皮再生のより良い成果および成果測定を可能にする。 M S C₃ およびその後代は皮膚等価移植片の支持のための活性再生真皮床を提供するように設計される。乳頭真皮、細網真皮、および多分皮膚移植片の下部にある筋層の部分を補充することにより、より多くの包括的な治療法を達成することができる。

一つの真皮再生産物の実施例は多層生体皮膚等価物の部分として組み込まれた自己由来 M S C₃ を含む。も一つの実施例は、生体皮膚等価移植片の配置の前に深い創傷に移植される M S C₃ のゲルあるいは他の処方を含む。組織の真皮層の置換は創傷あるいは潰瘍で皮膚あるいは皮膚等価移植片の適切で急速な組み込みを促進する真皮成長因子を提供する重要な機会を提供する。更に再構築真皮は治癒を速やかに支持する新しい宿主血管系を補充するための細胞網となる。

M S C₃ は皮膚の乳頭および細網真皮層で生じ、真皮内の M S C₃ 数は20歳を越えると一般に消失し年齢と共に減少する。 M S C₃ は胚皮膚球体 (E S S) およびコラーゲン層を含む試験管内多重培養システムで真皮細胞への分化を受ける。 M S C₃ は真皮線維芽細胞になすのと全く同じように培養

内でケラチノサイトの成長を支持する。更に、(1) MSC_sが真皮線維芽細胞を委託するか分化する時、および(2) MSCによりどのような種類の真皮細胞が生産されるか、を測定するために試験管内および生体内で利用できる標識を確定することが重要である。現在の所、真皮細胞に関する機能検定はケラチノサイトの支持およびコラーゲンゲルの収縮率を含む。細胞自身に関しあるいは細胞外基質において免疫化学標識は他のものの中でもコラーゲン(I、III、IV、VI、VII)、I-CAMS、N-CAM、ラミニン、フィブロネクチン、プロテオグリカン(HSPG、CSPG)、テナスチン、E-カドヘリン、ヘパリン結合成長因子、およびフィブリリンを含むものが現在使用されている。

MSC_sは適正な真皮再生よりも創傷治癒過程により貢献する。皮下に配置されると、MSCベース移植片は何日間かの内に広範な宿主血管系を展開する。更にMSC_sは外部刺激(例えばIL-1)に応答して数多くの造血成長因子(例えばGM-CSF、G-CSF、IL-6、IL-11)を分泌する線維芽細胞を含む試験管内各種細胞型に分化する。MSC_sが下にある真皮の構造成分を形成することに加えて血管系を補充し造血細胞を支持することにより治癒過程を支持する有効なツールになることをこれらの観察結果は示唆する。加えてMSC_sは細胞培養内の筋に分化し、かつ生体内で編菌類の筋管に分化しとり込まれることが示された。骨格筋は皮下層に存在する間葉組織であり、真皮移植片から移動するMSC_sは深い創傷部位に横たわる筋にある種の回復能を与える。かくしてMSC_s

の存在は創傷部位で多くの利点を持つ。

皮膚の深層を構成する線維芽細胞は源が間葉にあるが、その始原細胞からのこれら細胞分化の正しい系列経路は完全には理解されていない。間葉幹細胞(MSC_s)に類似した細胞が小児期全体にわたりまた若い成人期にヒト真皮で持続し、20歳以後は検出できない水準まで年齢と共に減少することが予備結果から知られている。真皮MSC_sは真皮表皮インターフェイスのケラチノサイト基底膜近く、細網真皮の血管系に接近し、また乳頭真皮の小胞に隣接して線維芽細胞の母集団を構成する。

M S C₃を含む皮下移植片は数日で血管を高度に発達させ、この細胞が激しい血管形成を支持することを示唆している。組織再生のために骨および軟骨部位でM S C₃を持つ移植片は免疫化学標識を用いる成長する胚で観察されるもののように同一段階の分化を通じて進歩し、修復が組織の個体発生を反復する真の再生現象をこの細胞が指示することを示唆している。

この発明の皮膚置換はヒトM S C誘導真皮始原細胞を表皮置換のための培養ヒトケラチノサイトと併用して真皮の再生のために使用し、多層生体皮膚等価物を形成する。M S Cベースの治療は、それが生体皮膚等価物、ヒト死体の皮膚あるいは自家移植片のいずれであろうとも皮膚移植への論理的な補充材となる。M S Cベースの治療は表皮ケラチノサイトの下にある真皮層に再生要素を加え、全層真皮再生をもたらす。この課程の治療は創傷部位への真皮始原細胞の受動浸潤に依存するのではなく、真皮の線維芽細胞前駆体の能動源を提供する。加えて

M S C₃は宿主血管系のより急速な侵入を合図する。活性真皮再生および増加血管形成の両方は皮膚移植の受容および周辺宿主組織への組み込みを加速するであろう。従ってこの発明の皮膚等価物は傷痕を少なくして治療を加速し従って入院期間を短縮する治療を提供する。

活性真皮始原細胞母集団を表皮層としての有効性の論証された培養ヒトケラチノサイトと組合せることにより、この発明の皮膚等価物は現在利用できるものよりもより効果的な生体皮膚等価物を創り出す。自家移植皮膚は不必要となるであろう。というのは自己由来調製物あるいは同種異系ケラチノサイトのいずれかのために患者の他の部位から健全でない組織を犠牲にする必要はないからである。培養でM S C₃を拡張する能力は大量の皮膚等価物を最初の骨髓吸引液から製造することを可能にし、そのため大きな創傷あるいは潰瘍区域を治療するための抑制的な障害は存在しない。M S C₃を分化細胞よりも真皮始原細胞の源として使用することにより、移植片の脱分化と関連する潜在的な危険性は最小化され、何故ならM S C₃の始原細胞の状態を制御することが可能だからである。例えば分化軟骨細胞の生体外拡張は、コラーゲンIIなどのようにすべての特異的軟骨細胞標識をもはや作らず、また動物モデルで関節軟骨再生を果たせない脱分化線維芽

細胞の増殖に導く。しかし除去顆の骨軟骨病巣に移植される培養拡張MSCは助軟骨下骨、肥厚性軟骨細胞、および関節軟骨細胞の正常層をすべて再生する。同じような様式で、高度に分化し委託された細胞母集団によるよりも、真皮線維芽細胞の始原細胞として作用するMSCに

より真皮再生が最良に達成される。

注射可能調製物、例えば無菌注射可能水性あるいは油性懸濁液が適切な分散剤あるいは湿潤剤および懸濁剤を用いる公知の技術に従って形成される。無菌注射可能調製物はまた無毒性非経口許容希釈剤あるいは溶媒、例えば1、3-ブタンジオールの溶液としての無菌注射可能溶液あるいは懸濁液である。採用される許容賦形剤および溶媒は水、リンゲル液および等張塩化ナトリウム溶液である。加えて、無菌不揮発性油が溶媒あるいは懸濁媒体として従来から採用されている。

この発明の組成物は更に従来の賦形剤、すなわち細胞あるいは活性成分と有害に反応しない非経口適用に適した薬理許容有機あるいは無機担体物質を含むことができる。適切な薬理許容担体は必ずしもそれに限定されないが、水、食塩水、アルコール、植物油、ポリエチレングリコール、ゼラチン、乳糖、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、滑石、ケイ酸、粘性パラフィン、香油、脂肪酸モノグリセリドおよびジグリセリド、ペトロエスラール脂肪酸エステル、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン等を含む。薬理調製物はもし望ましければ補助剤、例えば滑剤、防腐薬、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を与える塩類、緩衝液、着色、着香およびもしくは芳香物質、および細胞あるいは活性成分に有害な反応しない同様のものと混合することができる。非経口投与に特に適した賦形剤は溶液、とりわけ油性あるいは水性溶液、同じく懸濁液、エマルジョン、あるいは移植片よりなる。水性懸濁液は懸濁液の粘度を増す物質を含み、例えばカルボキシメチルセル

ロースナトリウム、ソルビトールおよびもしくはデタキストランを含む。選択肢として、懸濁液は更に安定剤を含む。

下記の実施例は更に説明するが、この発明を限定するものではない。

実施例 1

ヒト皮膚における間葉幹細胞エピトープ

胚形態形成における複雑なしかも正確な空間配列は、成人生物の構造的および機能性を獲得するために細胞が特異的時間段階および特異的現場で遺伝子を発現することを要求する。ヒト皮膚の発育に関する形態学的研究は成人において見られる未分化胚前駆体から最終段階表現型までの複雑性および遺伝子発現の段階的増加を明らかにする。皮膚発育を特徴付ける事象の連続的系列は皮膚発育における異なった段階あるいは事象を特定する標識の使用により助けられた(27)。細胞表面標識および抗原の使用は表皮の分化の状態を評価するのに特に価値があった。何故なら各種の系列段階で表皮の構造タンパク質およびケラチノサイトの細胞表面標識の両方が利用できるからである(25、27、28)。表皮のこの標識の利用は表皮胚形成および発育の構造および機能についての詳細な空間時間配列を可能にしてきた(24、28)。

しかし真皮の標識は間葉細胞あるいはより分化した真皮線維芽細胞と関連する細胞外基質分子に限定された。これらは特異的コラーゲン、エラスチン、プロテオグリカンの抗体、および真皮の他の構造タンパク質を含む(27)。しかし完全に欠除しているのは真皮細胞あるいは真皮間葉細胞もしくは線維芽細胞

の段階特異的副次集団を認識できる標識である。空間時間様式でまた限定された現場で調節されることが示され得る真皮の特異細胞に対する標識は真皮の胚形成および新生児から成人までの皮膚の発育に関する価値ある手がかりを提供するであろう。

真皮は胚として側板中胚葉から発育し胚真皮での有力な細胞型は後に真皮線維芽細胞に分化する間葉細胞である(23、42)。その関連基質成分と共に検出される間葉細胞の中にいくらかより分化した線維芽細胞が存在する。しかし他の細胞は多能性であり、血管壁および立線毛筋、脂肪細胞、および関連線維芽細胞に貢献する平滑筋に分化する能力を保持する。そのいくらかは内皮細胞として補充されることさえある。

間葉細胞が結合組織細胞の未分化前駆体として生後生命に持続すると多くの研

究者は考える (13)。成人生物の間葉幹細胞は胚中胚葉から誘導され、骨、軟骨、腱、靱帯、骨髄間質、脂肪細胞、真皮、筋および結合組織を含む各種の間葉表現型を生じる能力がある (16)。この概念への支持は、骨髄あるいは骨膜から分離された間葉細胞が適当な環境に置かれた時軟骨および骨などのような異なった表現型を形成できることを示す研究から来る (検討のため40参照)。ヒト骨髄誘導間葉幹細胞に対する細胞表面抗原はこれらの多能性始原細胞に特異的なモノクローナル抗体 (S H 2、S H 3、およびS H 4) により検出された。これらの抗体はまた骨膜および真皮にある希有細胞を認識する (21)。従って未分化間葉細胞のためのS H 2標識を使用することにより、この細胞の真皮発育に対する貢献

を検定することができる。

この研究において、我々はヒト真皮における未分化間葉細胞の離散性母集団の表面における発育の調節された抗原の存在および分布を報告する。この結果は、付属体、上に重なる表皮、および血管系を発育させる上皮間葉相互作用で見られるように、特異的現場で皮膚発育における間葉幹細胞の重要な構造的機能的役割を示している。

材料および方法

死後36時間以内の検死標本あるいは手術処置からの皮膚試料がケース・ウエスタン・リザーブ・ユニバーシティのヒューマン・コオペレイティブ・ティッシュ・ネットワークから得られた。皮膚標本の源は包皮、腹部、あるいは胸部皮膚であった。この源から提出された年齢グループは1日から84歳までであった。これらの生後試料は豊富であったので多くの試料が試験された (結果を参照)。過剰の皮下組織および脂肪は標本から注意深く切開され固定されていない組織はOCT-組織テック凍結培地に包埋され、液体窒素で凍結され、 -20°C で貯蔵された。6 μm 厚の凍結切片はゼラチン被覆スライドに置かれ空気乾燥された。

ヒト皮膚凍結切片の胚源はワシントン、シアトルのユニバーシティ・オブ・ワシントン、生物構造医学部のカレン・ホルブルック博士の好意で提供された。そ

れぞれ記載されたコホート（結果参照）からの少なくとも3種の異なった標本がこれらの試料で試験された。試験された年齢グループはヒト胎児の推定妊

娠年齢（EGA）58日からEGA140日までにわたった。

ヒト間葉幹細胞への抗体標識の生成はこれまでにヘインズワースにより記述されておりここでは説明されない。SH2抗体がこれらの研究用としてヘインズワース博士の好意で提供された（21）。組織切片は一次抗体と共に1時間室温で高湿度チャンバで保温された。培養上澄みが未希釈で使用された。保温に続きスライドは0.1%BSA-PBSで3回洗浄され、次いで0.1%BSA-PBSで1:2000に希釈されたフルオレセインイソチオシアネート（FITC）接合ヤギ抗マウスIgG（オルガノン・テクニカ）75-100 μ mで1時間保温された。スライドは3回0.1%BSA-PBSで洗浄され一滴のPPD免疫蛍光配設培地（ニューヨーク、ロチェスター、イーストマン・コダック）で覆いガラスされオリンパスBH-2エピ蛍光顕微鏡で観察された。負の対照スライドは、ヒト組織と交差反応せずしかしSH2抗体として同一の重複規準標本である抗体あるいはSB1ヒヨコ抗体（55）を含まない培養培地での切片の同一分析よりなっていた。この研究で利用された他の抗体はヒト末梢神経、中枢および末梢神経組織、髄鞘、稀突起神経膠細胞、シュブアン細胞、ニューロン、およびある種の神経膠星状細胞の酸性糖タンパク質を認識する神経特異的抗体HNK-1を含む（12、17、29）。モノクローナルマウス抗ヒト因子VIII関連抗原（DAKO）も内皮細胞および血管組織を認識するために利用された。正の対照はヘインズワースにより生成された抗体6E2を用いる切片の分析よ

りなり、多種多様のヒト組織と反応するヒト特異的モノクローナル抗体である。

結果

この免疫組織学研究はヒト間葉幹細胞を認識するモノクローナル抗体を用いて発育中で生後のヒト皮膚にあるエピトープの空間時間的分布を研究した。免疫染色はEGA78日から84歳の年齢までの皮膚標本で実行された。第3学期（EGA180日以上）からの標本は利用できなかった。もっとも表面にあるものか

らより深い水準までの皮膚のいくつかの層あるいは構造に伴う免疫反応性が表皮、発育中の毛胚芽あるいは毛包、真皮／表皮連結部、真皮の上半部、真皮深部にある血管系神経叢、および皮下組織に隣接する部分を含む真皮の下半部を含めて試験された。すべての標本で正の免疫反応性が反応性エピトープの存在を反映する選択的緑輝色蛍光染色パターンが視覚化された時に得点記録された。角質層あるいは真皮および皮下線維の自己蛍光がFITC励起で見られる緑輝色蛍光からたやすく区別できる黄ばんだ色として時々見かけられた。

簡単に述べると、皮膚胚形成および成熟は形態形成に関連した著しい真皮あるいは表皮時間標識構造に基づく発育の特異的な時期に組織化されてきた。これら発育期間の短い検討が我々の結果で提供される。

細胞真皮。この段階は皮下発育の後の期間と比較して相対的に小さい関連基質を持つ優勢の細胞真皮により含まれる。8-9週までに皮膚発育の胚および胎児段階の間での移行がある(36)。未分化間葉細胞は真皮の優勢細胞であり、それは

ゆるやかに組織された微小線維化成分の細胞外基質およびグリコサミノグリカンとコラーゲンのゼラチン状混合物により絡まれる。真皮は血管面により皮下区(皮下組織)から正確に説明される(36)。上に重なる表皮は周皮の単一上皮および基礎膜と関連する基底細胞への層別化により標識される(23)。表皮付属体はまだ形成されていない。SH2抗体による正の免疫染色が真皮の深部の血管系管腔に非常に近接した細胞への離散細胞表面染色で観察される。これらの間葉細胞あるいは脈管周辺細胞は表面表皮に平行に配向される傾向がある。更に決まった間隔を置いて血管面の離散細胞への免疫染色が存在する。表皮を含め真皮の血管面上部の層には免疫染色は存在しない。

細胞から線維への移行。第一学期の終り近くで生じるこの段階は細胞組織からより線維の多い組織への真皮の移行により特徴付けられる。小胞形態形成の開始は約11週でのこの時期の間に開始する(28)。毛胚芽(最初に認識できる小胞前駆体)が基底表皮細胞の焦点として見られ、それは真皮内に発芽し集団形成間葉細胞の収集物により取り囲まれる。真皮はコラーゲン線維束の拡大を経て線

維基質の累積を開始した(36)。SH2抗体での免疫染色は真皮深部での血管系への細胞ライニングに対する反応性および真皮深部での間葉細胞への分散された細胞に対する反応性を明らかにする。反応性は更にかなり決まった間隔で再び真皮の上半部に少しだけ分散された細胞でも見られる。基礎膜の下に細胞あるいは出現する毛胚芽に関連する間葉細胞に対する正の免疫染色は存在しな

い。

線維性真皮。この時期での真皮は真皮内深く伸びる発育中の表皮付属体と共にきわだって線維結合組織である。血管および神経は結合組織鞘と共に真皮中を流れる(44)。乳頭真皮内に分岐する乳頭下血管神経叢が存在する。皮下組織との真皮深部境界は脂肪および皮下結合組織で定義される(44)。乳頭および細網真皮の間の区別は主として二層にあるコラーゲン束の間の大きさの差により明らかとなる。SH2抗体での免疫染色は、表皮の下側にある基礎膜近くの表皮下層間葉細胞、発育中の毛胚芽および小胞、真皮深部および表皮下層微小血管神経叢の脈管周辺区域での細胞反応性、および真皮深部での単一細胞あるいは細胞グループに対する分散反応性を含む正確な位置で確認された細胞反応性の収集物を示した。

新生児真皮。出生後最初の2年以内の生後真皮は十分に確立された乳頭および細網層ならびに完全に形成された上皮付属体を含む成人皮膚と関連する形態形成標識構造をすべて有している。これは胚皮膚とは異なるが、それは後者で真皮厚の減少、筋原線維径、タイプIコラーゲンのタイプIIIコラーゲンに対する比率、および高い水分濃度によるものである(26)。SH2抗体での免疫蛍光は表皮の基礎膜の下に真皮／表皮連結部に非常に近い離散細胞に対する反応性を明らかにする。反応性は表皮と共に乳頭真皮でのみ認められ、細網細胞は反応性を欠いている。胚皮膚と比べてこれらの標本での免疫反応性細胞数の減少が見られる。

成人真皮。30歳以上ではSH2抗体での免疫染色は完全に

不在である。全部で69の生後標本が免疫染色された。男性30個女性39個の

試料が染色されたが5歳以上の年齢グループでは著しい差異は見られなかった。包皮試料の可能な11個の内11個全部が5歳以下の年齢のもので反応性を提示した。5歳以下のグループの4個の腹部、試料の内1個のみが反応性を示した。21歳-30歳の年齢グループで見られる反応性は女性乳房皮膚からの試料を表していた。

これら年老いた年齢グループでのSH2抗体に対する免疫反応性の欠除はエピトープ不顕化では多分説明できないが、それは実験がヒアルロニダーゼ、トリプシン、コンドロイチナーゼ、およびコラゲナーゼを含むいくつかの細胞外基質消化酵素を用いて行われたためであった。細胞外基質の消化はSH2抗体で免疫染色されたエピトープを顕化しなかった（データは示されない）。

神経および血管標識。SH2抗体染色が真に血管系細胞器官（オルガネラ）の細胞成分に対するものであったことを確認するために、因子VIII関連抗原に対する抗体が利用された。抗因子VIII関連抗原抗体免疫染色は発育中の皮膚にある深部血管系神経叢に対応する深部真皮にある血管系細胞器官に対する反応性を明らかにした。血管系のライニング細胞（内皮細胞）に対する反応性のいくつかはSH2抗体と反応する同じ細胞であったかどうかを確認することは難しかった。明らかにSH2抗体はある種の脈管周辺細胞と反応する。しかしSH2抗体が血管系の外部結合組織鞘成分のいくつかとあるいはいくつかの内皮細胞と反応することは可能である。神経特異的HNK-1抗体は、

発育中の皮膚にあるSH2正細胞が神経系の細胞と反応性であるかどうかを決定するために利用された。表皮下層免疫反応性細胞がHNK-1抗体で染色された。HNK-1抗体の形態学は長く細い殆ど線型の細胞反応性を明らかにした。発育中の毛包のもっとも近位位置のものもこの抗体と反応した。これら二つのパターンはSH2免疫反応性で認められたパターンとは明らかに識別された。

議論

ヒト皮膚に存在する骨髓誘導間葉幹細胞に対するエピトープが存在し、またこれら細胞の時間空間的分布は発育および年齢と共に変化する。特異的には、免疫細胞の数とこれらの細胞が居住する焦点は年齢と共に減少した。間葉幹細胞エピ

トープの時間空間パターンについての我々の解釈は表2に要約される。基礎膜近くの表皮下層間葉細胞、発育中の毛胚芽および小胞の底部にあるユニーク細胞、真皮の深層部での分散反応性、および発育中の血管系と密接に関連する細胞のグループを含む正確な位置は第二学期を通じて胚試料で確認された。生後の皮膚において、間葉幹細胞の反応性は基礎膜に近接する真皮表皮連結部に近い乳頭真皮の希有細胞で認められた。これらのエピトープは0-20歳の若い先代の標本の約80%で認識された。20歳以上の年齢の試料はいずれかの正の免疫染色パターンを殆ど示さなかった。しかし重要なことは、真皮の深い区域での細胞に対する反応性は胚皮膚試料とは著しく対照的に視覚化されなかった。生後試料の包皮から取られた区域は殆ど一致して反応性を示したけれども、正の試料での免疫染色パターンによ

る局部的あるいは解剖学的変化はなかった。

ヒト胎児組織を使用した観察は表皮下層間葉細胞に対する正の免疫を明らかにした。分娩後、同じく基礎膜下部区域の長さに沿ったより大きな分布と比較して免疫正であったこの地域での細胞は量的により多かった。また免疫正細胞は分娩後皮膚と比較した時胎児皮膚の真皮のより深い区域で認められた。特に発育中の毛包あるいは毛胚芽の底部で離散細胞に免疫染色があり、また血管系のライニング細胞に近接する真皮の深層にある細胞グループに対する反応性が存在した。SH2が確認した細胞は、神経組織を認識するHNK-1抗体との実験に基づく神経系の樹状細胞と同時局在化しなかった。従ってSH2が上部真皮で認識する細胞が神経系科のものであるかどうかは疑わしい。因子VIII関連抗原抗体での免疫染色は、SH2抗体および因子VIII関連抗原抗体が血管系であると解釈された構造を認識するため、SH2抗体も同様に発育中血管系に関連する細胞を明らかにすることを示す。しかし因子VIII関連抗原は発育中の皮膚において微血管系の成熟の度合いにつれてより突出するようになる標識であり、内皮細胞分化のための標識として仮定されてきた(49)。従ってそれはすべての未分化前駆体血管細胞、とりわけその初期発育期間中のものを認識しないことがある。

ヒト皮膚のヒト間葉幹細胞に対するエピトープが存在した確認細胞の特異的

な発育分布があることはデータから明らかである。変化する発育段階でのヒト骨髄誘導間葉幹細胞に対するエピトープの免疫反応性パターンにおける差異はそれぞれの現

場に基づいて発育中毛包、上に重なる表皮、および血管系の真皮表皮交差作用において重大な機能役割を多分果す間葉間細胞の真皮貯蔵所という仮説を支持する。これらの役割は多分各種のオートクリンおよびパラクリン細胞合図分子の分泌、ならびに真皮の物性に重要な細胞外基質の保持および精緻化を含む。

細胞グループにおける正確な変更を評価できるように、我々は時系列における発育細胞の形態形成に焦点をあてた。皮膚組織の発育および老化に伴うSH2エピトープの発生と減退、および真皮線維芽細胞および間葉細胞のはっきり識別できる副次集団が免疫正であるという観察は真皮発育の表現型特異的標識の証拠を示唆する。皮膚内の間葉幹細胞を認識するエピトープの存在は真皮胚形成からの源を持つかも知れず、何故なら真皮の成分は体節中胚葉の浅真皮節分節から、また皮膚の下方にある身体の間葉区から生じるからである(23)。段階特異的表現型で際立った分子をその表面で発現する真皮線維芽細胞の副次集団は発育および段階特異的変異体の連続的系列で始原細胞あるいは初期段階を表すものと考えられる。系列と呼ばれるこの発育上の連鎖は免疫学的に検出できない特異的細胞表面エピトープをしばしば表す(16)。細胞抗体染色が間葉幹細胞に特異的に真皮線維芽細胞系列の前駆細胞を表すことを我々は示唆する。SH₂抗体は間葉幹細胞の副次集団で発見されたエピトープを認識する。間葉幹細胞は適切な環境に置かれた時に骨や軟骨などの異なった表現型を形成することを示してきた(21、22)。

更に真皮の発育は表皮に生じる幹細胞の分化に類似してもつ

とも遠位の位置からより表面あるいは近位の現場まで進行することを結果が示唆している(20)。これはデータで示唆されるがそのデータは真皮の最深部にまた第一学期に真皮を皮下組織から隔てる血管境界で免疫正の間葉幹細胞が豊富であることを示し、また胚発育の間および初期の生後年齢でこれらの細胞の表皮へ

より近位に移行することを示す。

更に間葉幹細胞が皮膚で居住する現場の重要性も考えられねばならない。毛包の発育は複雑な上皮間充織相互作用を表す。小胞のもっとも初期の認識可能前駆体である毛胚芽は基底表皮細胞の焦点を表し、この細胞が真皮-表皮連結部の下部に規則的に隔てられた特殊な間葉細胞の収集物近くの真皮に発芽する(28)。これらの細胞のいくつかが真皮間葉の細胞と比較された時異なった標識を発現することが知られている(51)。毛胚芽は第二学期までに後で毛ペッグ内に発育し末端は球根状構造に形成される。この構造の上皮細胞は内側根シートおよび線維を後で生じさせ周辺間葉細胞は後で真皮乳頭の有機構造をとる(28)。興味深いことは、間葉源のものであるこれら真皮乳頭細胞は明らかに小胞形成を誘導し毛髪成長および毛髪品質を決定することを示されてきた(52、53)。

間葉幹細胞抗体反応性は真皮の微小循環系に非常に近接して存在することが認められた。胚真皮で見られる未分化間葉細胞は血管内皮細胞および多分血管周囲細胞を生じさせると思われる(13)。内皮細胞の前駆体、平滑筋細胞、および血管系の他の特化細胞は脈管周囲間葉細胞であると考えられる(37、39)。これらの前駆体はその分化後代、つまり微小循環

系および血管系自身に近接することが期待されるであろう(41)。更に血管周囲間葉細胞は血管形成と関係し毛管新芽形成の初期相となることも知られている(54)。その解剖位置に基づいて、血管系に近接して位置する間葉幹細胞は血管形成に参加する未分化前駆体であるように見える。確かに、間葉から誘導される血管周囲細胞は多能性を示すことができ、骨芽細胞および平滑筋細胞などの細胞表現型の前駆体となるであろうことも知られている(15、39)。

データはまたヒト骨髓誘導間葉幹細胞のエピトープに対する年齢の関連した反応性の変化を示唆する。結果は年と共に間葉幹細胞数の減少を明らかにする。胚および新生児の皮膚発育でのとてつもなく大きい形態形成および成長要件のためこれは全く筋の通ったことである。年齢と共に間葉幹細胞数が減少することは骨髓などの他の組織でも見られ、これらの細胞の減少は年齢と共にこの器官での骨形成組織の能力および量の減少を部分的に説明するものとなる。この間葉幹細胞

数の減少は皮膚での代謝結果を持ち、何故なら真皮に居住する細胞が表皮増殖および保持について多くの調節機能を持つためであると仮定することができる。老化と関連して知られる皮膚の変化は真皮-表皮連結部の平板化、表皮交代の減少、疾患の増加および表皮ケラチノサイトの異質性、ならびにコラーゲンおよびエラスチンなどの細胞外基質成分の変化などを含む(19、32、34、48)。

この研究の一つの仮定は、間葉幹細胞から誘導される骨髄を認識するエピトープは更にヒト皮膚にある同じ細胞型も認識す

るということである。多能性細胞および複雑な上皮間充織相互作用が生じる区域へのエピトープ反応性の特異的現場が偶然の一致ではないと我々は信じる。エピトープ反応性の現場は明らかに間葉源の未分化細胞に解剖学的機能的意味をなす。この研究は明確な免疫組織化学および組織学的観察に依存するけれども、将来の研究はこれらの細胞が骨髄から誘導される間葉幹細胞の表現型特性を示すように分離され証明されるように実行される必要がある。これらの試験は他の免疫標識の存在あるいは不在およびもしくは適切な環境に置かれた時に多重表現型を形成する能力を含むものである。

実施例 2

M S C₀の真皮線維芽細胞への分化のための試験管内システムの確立

このシリーズの研究はヒト真皮線維芽細胞をM S Cから区別する試薬の開発に向けられる。これらの試薬(抗体、オリゴヌクレオチドプローブ、成長因子への応答)は、M S C分化のこれらの標識が名目上の開発と相関するかどうかを決定するために発育する皮膚(胚皮膚球体、胎児組織の凍結切片)に対して選別される。一度標識が選択されると、M S C₀は真皮系列内でその分化を促進する条件(例えば培地、基質分子、可溶成長因子、同時培養細胞を変えることにより)の下で細胞培養内で試験管内処置される。真皮形成の定量検定を行うことのできる従来の決められた培地を生産するための真皮分化に必要な成分が確認される。最終的には、M S C₀のための真皮分化の標識が次いでM S C後代の間で乳頭および細網真皮源を区別するた

めにこれら2個の亜型を比較される。

真皮分化の標識を区別する試薬の生産はモノクローナル抗体分離および分子クローニング戦略を含む。抗体方法論は他の系列で成功したものを利用し、とりわけ骨形成分化のものを利用する。細胞表面抗原はヒト真皮線維芽細胞の健全細胞調製物あるいは原形質膜分画でマウスをまず免疫化することにより標的とした。これらの細胞は一次組織外植片からもしくは以下に記載されているように利用されるヒト細胞系のいずれかから誘導することができる。免疫血清および続いてハイブリドーマ上澄みの選別は未分化MSC。対真皮線維芽細胞系の一次組織で行われる。MSC。よりも真皮細胞に特異的な抗体は免疫蛍光によりヒト胎児新生児未成熟および成人皮膚生検材料を凍結切片で使用して更に二次選別スクリーンに運ばれる。顕微鏡下での組織の選別は退屈であるがそれは試験管内正常分化をもっとも密接に反映するこれら抗体の選択を可能にする。

選択された抗体は免疫方法により真皮および真皮細胞からの対応する抗原を精製するために使用される。抗原の部分配列分析はもし知られているならば現存する配列データベースからのタンパク質を同定するために適切であろう。さもなければ、cDNAは真皮線維芽細胞cDNAライブラリーからの標準分子クローニング手順により同定されるであろう。抗原がタンパク質ではない場合（例えば炭水化物）、標準分析化学技術が化学組成物および質量分析測定のために利用される。

新規なcDNAを同定するために分子アプローチが抗体発見と平行して行われる。これらの実験は1) RT-PCRおよび

変性プローブを用いるポリA⁺ RNAの直接オリゴヌクレオチドプローブにより既知の科の分子でのMSC。および真皮線維芽細胞系の選別、を含む。これは既知のグループ、例えばTGF- β レセプター上科、インテグリン科、免疫グロブリン/細胞付着分子上科、等の部材である新規な分子を決定するために行われる。これらの選別が継続するにつれて、差別表示技法が真皮細胞に見出されるがMSC。にはないcDNAを同定する。部分DNA配列は既に知られているものから新規な分子を同定するのに十分あったが、新規なイソ型あるいは公知のスプラ

イス変異型はより広範な分析を必要とするであろう。同定された新規な分子にはポリクローナル抗体が細菌発現組換え融合タンパク質あるいは合成ペプチド抗原のいずれかに対してラビットで調製された。これらの抗体は真皮内のタンパク質産物の存在を確認するために有意義に使用される。

ヒトMSCの一次培養は試験管内真皮分化検定を組立てるために利用された。簡潔に言えば、腸骨稜骨髓吸引液 (20 ml) がボランチアドナーから得られ骨片を除去するために濾過される。細胞懸濁液は 1.073 g/ml 密度のパーコル段階勾配で層化され、インターフェイス分画が収集される。細胞はMSC選択および拡張のためプラスチック組織培養フラスコで平板培養される。細胞が80-90%密集に達すると、それはトリプシン消化され、洗浄され、1:3の密度で再平板培養される。

サイクリン依存性キナーゼ阻害剤 (cdk i) として知られる細胞分裂サイクルの阻害剤がMSCの分化に対する委託に

際し非常に早く発現されることを予備研究が立証した。ルシフェーラゼリポーター遺伝子構築物がこれら cdk i 遺伝子の一つのプロモーター P21 (c i p 1 , w a f 1) の制御の下で調製された。これらの構築物は電気穿孔法によりMSCに形質移入され、MSCで委託を強行する分子はそのルシフェラーゼを発現する能力を知るため急速に選別される。続いて確立された細胞表面および真皮線維の基質標識が分化の二次確認として使用される。

このシステムで分化因子を同定することで重要なのは分化細胞の長期生存を促進するための培養培地および添加物の発達である。添加物候補のリストはPDGFおよびTGF- β 上科のメンバーなどのように他の培養システムでMSCに作用するものとして知られるポリペプチド成長因子を含む。MSC分化を促進する基質タンパク質は皮膚発育の間に高度に調節されるものとして知られるフィブロネクチンを含む。例えばノーザン分析でMSCにより生産される発現フィブロネクチンは定量され、培地への添加物としてあるいはコラーゲンに直接付加されるフィブロネクチンの用量依存性が研究される。これらの研究と協力して、細胞のインテグリンプロファイルが潜在的なフィブロネクチンおよびコラーゲンレセ

プターのプロファイルを決断するためにモニターされる。一次MSC調製物は例えば $\alpha 4$ および $\beta 2$ インテグリンに対し負であるとして知られるが、これらおよび他の表面標識には力強い変化が起こり得る。分泌プロテオグリカンプロファイルは現存のモノクローナル抗体を使用して分析される。

代替的アプローチはMSCとヒトケラチノサイトの同時培養である。MSCがケラチノサイトの成長を支持できることを予備データが示しており、ケラチノサイトがMSCに真皮線維芽細胞あるいは真皮前駆細胞への分化を起こさせる因子を生産することを示唆している。直接同時培養が行われ、また平行して実験がケラチノサイト調節培地、照射ケラチノサイト培養、およびケラチノサイト培養により貯蔵された基質で調節された平板で行われる。ケラチノサイト細胞表面あるいは調節培地もしくは調節基質からの分子は大量培養から大口で分離され、タンパク質成分の特徴付けが行われる。

実施例 3

生体皮膚等価物を生産するためにMSCsは試験管内ケラチノサイト成長を支持する

これらの研究はMSCの後代が多層系でのヒトケラチノサイトを支持することを論証できる点まで試験管内真皮分化モデルの発展を述べる。実験作業のための戦略は以下の通りである。第1、ケラチノサイトの供給層として作用するその能力を確認するためのMSCの機能検定；第2、乳頭真皮線維芽細胞になすのと同じくコラーゲンを収縮するMSCの能力を確認するためのゲル収縮検定；および第3、ケラチノサイト層の追加ありもしくはなしで水浸コラーゲンゲルでのMSC誘導真皮細胞の成長。

機能検定

MSCの最初の検定はラインバルドグリーン法〔9〕を修飾したものであり、ここでは照射間質細胞がケラチノサイト

の供給層として作用する。22ヶ月および51歳の患者からの皮膚乳頭あるいは真皮層からの真皮細胞系が入手された。100mm皿当たり約 10^5 で播種された

真皮細胞あるいはMSC₃がコバルト源から5100ラドを受けた。細胞は増殖を中止するがなお生存する。包皮ケラチノサイトが低い密度（皿当たり2000細胞）の皿で播種され培地〔9〕で9日培養された。ケラチノサイトコロニーの計数がクリスタルバイオレット染色の後で行われた。乳頭真皮細胞およびMSC₃が類似の数のケラチノサイトを支持し、これらは細網真皮細胞で支持されるコロニー数よりも著しく高いことを予備研究は示している。

コラーゲングル収縮検定はMSC誘導真皮細胞が浮遊するタイプIコラーゲンを収縮する速度をモニターするために使用される。コラーゲングルでの最初の48時間の平板培養の間に、細網真皮細胞は乳頭真皮細胞に比べて著しく高いゲル収縮速度を示す。従って、分化の規準として、MSC₃およびその後代はそのゲル収縮速度が乳頭あるいは細網速度により密接に類似するかどうかを試験される。乳頭真皮細胞への類似性はケラチノサイト培養の有効な支持と相関するであろう。

細胞同時培養の最適化

MSC分化の試験管内システムからの条件は同時培養でのケラチノサイト成長を促進するために最適化された。これは可溶ポリペプチド因子ならびに基底培地成分の用量および時間依存性を伴う。これらの研究の詳細についての実施例はアミノ酸、ビタミン、イオン、ステロイドおよび脂質を変化させた個別の

培地処方を含む。目標は包皮ケラチノサイト成長を支持するMSC誘導真皮細胞の非照射培養物のための条件を最適化することである。最終的に、多層同時培養は表皮表面の角質化を開始するために空気-水インターフェイスにまで持ち上げられた。

実施例 4

ヒト乳頭・細網真皮線維芽細胞を含む二重層化真皮等価物の構築

ヒトあるいは他の種からの線維芽細胞を含む真皮等価物は公知である（56-61）。一方これらの真皮等価物はケラチノサイト増殖および分化を支持するが、その設計は乳頭真皮および細網真皮という2種の形態学的にも機能的にも異なった層よりなる真皮の天然の二層相対配置を模倣することで改良される（62）

。相対的に薄くきわめて細胞性である乳頭層は基底層および表皮の下部に直接隣接して位置しており、一方より深部で密度の高いコラーゲン状細網層は大量の真皮を含む。これら2種の真皮層それぞれは内因子的に異なった細胞母集団を含む(63-66)。これらの細胞が個別にあるいはいろいろな組合せでケラチノサイトの増殖および分化をどのようにして支持するかについては殆どわかっていない。この実施例はそれぞれが定められた層で乳頭および細網真皮細胞を含む二重層真皮等価物の構成を示す。

ここで企画された研究は層化真皮等価物の構築の実現可能性を立証する。組合せられたヒト乳頭・細網真皮細胞系(すなわち同一個体からのもの)がこれらの細胞を無作為混合物として

あるいは決定された層としてタイプIコラーゲングルに播種して真皮等価物を構築するために使用された。これら真皮細胞の異なった母集団の移動を追跡するために、これらの細胞が一度ゲルに播種されると、それを分化させる技術を発展させることが必要となった。従って、我々は特異的かつ個別に乳頭および細網真皮細胞を標識しコラーゲングル内でその細胞の動きをモニターする手段を提供するために、蛍光生体染料、1, 1'-ジオクタデシル-3, 3, 3', 3'-テトラメチルインドカルボシアニン・パークロレート; DiIC₁₈(3) (DiI) および3, 3'-ジオクタデシルオキサカルボシアニン・パークロレート; DiOC₁₈(3) (DiO)の使用を探究した。

標識手段は2個の基本的規準と合致する。第1に、細胞は研究期間を通じて標識を保持する。第2に、標識細胞の生理機能は弱められない。細胞の混合母集団を含むゲル内で乳頭細胞と細網細胞の分類は行われず、また乳頭細胞と細網細胞は層に播種される時それぞれの層に留められる。従って真皮の天然の相対配置を真皮等価物に再創出することが可能となる。

材料および方法

乳頭および細網真皮線維芽細胞細胞系

2種の異なった乳頭および細網真皮細胞系(オハイオ、クリーブランド、メトロヘルス・メディカル・センター、I. A. シェイファ博士の提供による)がこ

これらの研究に使用された。細胞系の一つの組合せセットは51歳の個体（ライン4乳頭および4細網）から確定されまた第2組合せセットは22ケ

月の個体（ライン6乳頭および6細網）から確定された。組合せ乳頭および細網細胞系の分離および培養に関する詳細は公開されている（6）。簡潔に述べると、皮膚節が0.38mmの深さで腕の上側内部からの皮膚の上部層を入手するために使用されまたこの上部層から成長する線維芽細胞が細胞の乳頭母集団を構成する。残る真皮は皮下組織に切断されこの層から成長する線維芽細胞は細胞の細網母集団を構成する。乳頭および細網真皮細胞は単層細胞、成長動力学、密集での集合密度およびタイプIコラーゲンを収縮する相対能力に従って特徴付けられた。

真皮細胞系の2種の組合せセットの検定は同時に行われた。ドナーの離れた年齢から予期したように（66）、細胞系の2組に対する成長運動および収縮運動はお互いに異なっていた。しかし生体染料の存在は細胞のいずれの組合せセットの成長特性あるいはゲル収縮特性を著しく変更しなかった。単純化のために51歳の個体からの1セットだけのデータが提供される。

カルボシアニン染料DiIおよびDiOはオレゴン、ユージン、モレキュラー・プローブより購入された。無水エタノール内でのDiIの2mg/ml貯蔵液が前もって調製され、20℃で貯蔵された。使用の直前に、貯蔵液は10%胎仔ウシ血清で補充されたダルベッコ修飾イーグル培地（完全DMEM）で1:250で希釈された。真皮細胞の単層培養から回収された培地は染料を含む完全DMEMで置換され、培養液はいろいろな時間期間で保温された。5%CO₂95%空気を含む加湿雰囲気中で37℃で一晩保温されたものが最適である

ことが発見された。染料を含む培地は除去され過剰染料は無菌タイロッド液で2回すすぎ洗いで除去された。標識細胞は研究に必要な時まで培養皿で保持された。通常これらの細胞は標識後直ちに使用された。この時点で、細胞はニューヨーク、グランドアイランド、ライフ・テクノロジーズの0.25%トリプシン-1mmEDTAを用いて皿から分離された。細胞ペレットは再平板培養前に完全D

MEMで2回洗浄された。しかしタイプIコラーゲンゲルに取り込まれるべきこれらの細胞は洗浄され無血清DMEMに再懸濁された。

DiO飽和溶液が染料1-2mgを無水エタノール1mlに加えて調製され貯蔵液は4℃で貯蔵された。使用の直前に貯蔵液は遠心分離され上澄みのアリコートが無血清DMEMで1:20に希釈された。0.25%トリプシン-1%EDTAで培養皿から遊離された細胞は無血清DMEMで2回洗浄され、ペレット化細胞は希釈DiOで再懸濁され各種時間期間で保温された。室温で10分の保温が最適であることが発見された。染色細胞は平板培養前に完全DMEMで、あるいはもし細胞がコラーゲンゲルに取り込まれるべき場合には無血清DMEMで2回洗浄された。

細胞数の決定

未染色乳頭および細網真皮線維芽細胞が重複して皿当たり50、100、150、200および250×10³細胞の密度で35mm培養皿に播種された。細胞数は血球計数器の計数で決定された。最初の平板培養効率は乳頭細胞と細網細胞で変っていた。しかし2日までに皿当たり細胞数は最初の接種材料

のそれと同等であった。従って2日が標準曲線の世代として使用された。

細胞数はクリスタルバイオレット検定により決定された。単層培養物はタイロード平衡塩類溶液の1%グルタルアルデヒドで2-15分平板に固定され、水で洗浄され、空気乾燥された。細胞は0.1%クリスタルバイオレットで30分染色され、過剰染料を除去するために水で3回洗浄された。空気乾燥後染料は水の中で1%のトライトンX-100で抽出された。クリスタルバイオレット染料抽出物の吸光度は600nmで分光測光器で読み取られた。DiIもDiOも600nmで光を吸収しない。従ってそれらのものの存在はクリスタルバイオレット検定に影響しない。各細胞系の標準曲線はこれらの読み取りの平均値から用意された。これら標準曲線から外挿して、250,000乳頭細胞の吸光度は0.942であり、細網細胞の値は1.166であった。

コラーゲンゲル

ウシ皮膚から酸抽出されたタイプIコラーゲンはガットフォッス（フランス、

サンプリースト) から購入された。この産物は $3 \text{ mg} / \text{ml}$ のコラーゲンを含み、その $95 - 97\%$ はタイプ I である。使用の前に、コラーゲンは $\text{pH } 3.0$ 塩酸で調節された水に対し 4°C で透析され、また温度は 4°C で維持されたまま $2 - 3$ 時間紫外線の下で無菌化された。乳頭および細網線維芽細胞は Di I あるいは Di O で標識あるいは標識されたもののいずれも室温で無血清 DMEM に懸濁された。細胞懸濁液の 1.5 ml アリコートが冷却コラーゲン 1.5 ml ア

リコートと混合された。この混合物は速やかにマサチューセッツ、ケンブリッジ、コスターの $6 - \text{ウエル}$ ($35 - \text{mm}$ ウエル) 培養皿のウエルに注がれた。平板は 37°C で 15 分保温され、コラーゲンのゲル生成を可能にした。丁度十分な $\text{DMEM} + 10\% \text{ FBS}$ がゲル ($\text{約 } 1 \text{ ml}$) を覆うためウエルに加えられた。二重層化ゲルが前記と同じ方法で調製され、但し量としては各細胞懸濁液およびコラーゲンの 0.75 ml が各層のために使用された。第1層は約 15 分ゲル化され、第2層は第1層の上に注がれた。ゲルは無菌の平たい秤量へらを用いてプラスチックから遊離され、次いで追加の 1 ml の培地が各ウエルに加えられた。浮遊するゲルを含む平板は $5\% \text{ CO}_2$ および 95% 空気を含む加湿雰囲気中で 37°C で保温され、培地は $4 - 5$ 日毎に交換された。ゲル収縮の範囲はゲルの直径を測定して決定された。3個の複製ゲルが各実験セット毎に測定された。ゲル収縮研究の終結に際して、各セットからの1個のゲルが組織学試験で処置された。各ゲルの半分は $\text{pH } 7.4$ のリン酸緩衝液 0.1 M 内で 10% ホルマリンで 4 時間 4°C で固定された (71)。固定および非固定ゲルは組織テック O.C.T. 包埋培地 (インディアナ、エルカート、マイルズ、サイエンティフィック) に凍結され、 $8 \mu\text{m}$ 凍結切片が切断されスライドが調べられる直前まで凍結貯蔵された。カバーガラスはフェニレンジアミンを含むグリセリンベース配設培地で配設された。

週間隔で5週まで取られた他のコラーゲンゲルは半分に切断された。ゲルの半分は O.C.T. 包埋培地に直ちに包埋され、ゲルの半分は O.C.T. 培地に包埋される前に緩衝

10%ホルマリンで一晩固定された。前もっての固定なしで、染料はカバーガラスが配設された時速やかに切断細胞から拡散された。標識細胞は同定できたけれども、より良い結果はホルマリンで最低30分固定された試料から得られた。

すべての写真はオリンパスBH2写真用顕微鏡でフルオレセインあるいはローダミンフィルターセットおよびコダックTmaxASA400フィルムで撮影された。

結果

DiIおよびDiOでの真皮細胞の標識

染料寿命の研究

乳頭真皮および細網真皮から個別に固定されたヒト細胞系はDiIおよびDiO生体染料の存在下で保温され、すべての細胞が標識されることになった。DiIで標識された細胞はローダミンフィルターで見た時明るい赤色に見え、また大抵のこれらの細胞は適所でフルオレセインフィルターでも見ることもできたがその強度は非常に弱いものであった。あるフルオレセインフィルターを使うと、DiI標識細胞は黄色に見え、それは緑色のDiO標識細胞から、またフルオレセインイソチオシアネート接合抗体を持つ免疫標識からDiI標識細胞を識別することを可能にした。他のフルオレセインフィルターを使うと、DiI標識細胞は緑色に見えるがそれでもローダミンおよびフルオレセインフィルターの両方で見た時その可視性のおかげでまだ同定することができた。4個の細胞は図1で顕微鏡視野に存在する。パネルAでは、写真はフルオレセインフィルターで適所で撮影され4個の細胞すべてが可視である。しかしパネル

Aで矢印で示されるDiO標識細胞はローダミンフィルターが適所にある時はもはや可視でない（パネルB参照）。DiI標識の強度は適所にあるフルオレセインフィルターを用いた視覚化では重要な因子である。図1に示されるように、無傷細胞は切開細胞よりもDiIにより強力な信号を放出し、そこではフィルターを切り換えることによりDiI標識細胞とDiO標識細胞の間を明らかに識別することがしばしば可能である。

染料の寿命は二つの状況下で研究された。単層として成長した細胞、およびタ

イブ I コラーゲンゲルに取り込まれた細胞の場合である。真皮線維芽細胞がプラスチック培養皿に播種される時、それは密集を達成するまで付着し分裂する。これらの染料が細胞分裂に際して希釈されるので、十分な量の染料が密集で保持されるかどうかを決定することが重要になる。これとは逆に成人真皮細胞がタイプ I コラーゲンゲルに播種された時、細胞増殖は著しく抑制される (7 3 - 7 5) 。この状況では起こるかもしれないいずれかの染料損失は膜あるいは細胞器官の代謝回転などの代謝因子によるものである。

低密度で播種される場合には、真皮線維芽細胞は 1 2 日までの期間分裂を続け、この時までに培養は密集になる。この研究で採用された条件の下で、乳頭真皮細胞は典型的には 6 乃至 7 回の細胞分裂を受ける。このような分裂に続き、強く染色、適度に染色、あるいは未染色の細胞の割合は培養皿からの細胞のトリプシン消化およびその細胞を計数に適したより低い細胞密度で顕微鏡用スライドに再平板培養することにより決定された (表 1) 。

表 1

活発に分裂する真皮線維芽細胞における D i I および D i O 標識

乳頭細胞	D i I 標識		D i O 標識	
強く標識	1 4 3 ^a	4 6 ^b	4 2	1 4
弱く標識	1 7 1	5 4	1 0 4	6 5
未標識	0	0	6 3	2 1
細網細胞				
強く標識	7 7	5 1	1 3	7
弱く標識	7 4	4 9	1 3 0	6 9
未標識	0	0	4 5	2 4

a 計数された細胞数。 b 計数された全細胞数の割合。

初めに、すべての細胞は標識された。ここで示された標識細胞の割合は標識 1 4 日後に測定された。

細網真皮細胞よりも速い速度で成長する乳頭真皮細胞では、すべての細胞が 6 回から 7 回の細胞分裂後に D i I で標識を続けられた。しかし D i O 標識細胞は

標識されるとして記録されたD i Oで染色された細胞の僅か約60-70%で強度を減少させた。二つの染料は細胞分裂で希釈されるように見えたが、細胞は染料の著しい損失なしでいくつかの分裂を受けることができることをこれらの観察が示している。D i Iの寿命はD i Oよりも優れているように見えるが、それは多分前者のより高い励起強度の故でありおおよしくは多分より高い量が細胞により吸収される故である。いずれの染料で染色した結果でも細胞形態上検出可能な変化はなかった。

タイプIコラーゲンゲルに取り込まれた標識細胞は5週までの期間培養された。固定されたゲルの凍結切片の顕微鏡試験はすべての標識真皮細胞が染色され続けたことを明らかにした。これは、ここで報告された条件下でこれらの染料を保持する細胞膜および細胞質細胞器官の代謝回転による染料損失が最小であることを示している。

標識化および未標識乳頭および細網真皮細胞の成長運動

成長曲線は三つ組みの30,000個細胞を35mm培養皿で平板培養し、2日から10日までクリスタルバイオレット検定を用いて細胞数を測定することにより決定された(69,70)。図2で示された成長曲線を創り出すために使用されたデータは対t試験を用いて統計的に分析されD i I-およびD i O-標識細胞に対する値は95%密集水準で異なっていないことが発見された。かくしてこれらの生体染料で標識された細胞はその未標識相手方がなしたと同じ速度で成長した。8日のD i O標識乳頭真皮細胞に明らかな減少があった。この減少はこの時点で統計的に有意ではなかったけれども、D i O標識真皮細胞が平板から分離し始める過程の開始を示すように見える。この過程は細胞がより長い時間培養される時に強まる。D i I-およびD i O-標識真皮細胞を用いる真皮等価物の構築

遊離浮遊タイプIコラーゲンゲルに取り込まれた時、真皮線維芽細胞はゲルの収縮を誘導する(56-59,66,67,74)。収縮は最初の急速相で起こり、それは約48時間継続し次いでより緩やかな収縮の持続相となる。最初の48時間の

収縮速度は乳頭および細網真皮細胞を識別するものとして有用であることが示されてきた(66)。期待されたように、等数の細網真皮細胞は乳頭真皮細胞がなしたよりも速い最初の速度でゲルを収縮した(図3)。ここで報告された条件の下でDiIおよびDiOでの標識化はゲルを収縮するどちらの型の真皮細胞の能力をも変更しなかった(図3)。未標識および染料標識細胞のデータは対t試験を用いて比較され95%密集水準で統計的に有意であることが発見されなかった。しかし染料のより高い濃度で標識された細胞は著しく減少した速度でゲルを収縮した(データは示されていない)。

混合二重層化ゲル内での乳頭および細網真皮細胞の同定

真皮および皮膚等価物は乳頭および細網真皮線維芽細胞をその天然相対配置、すなわち二重層に含むように調製された。等数の乳頭および細網真皮細胞を含むコラーゲンゲルが無作為混合物あるいは明確な層としてのいずれかでタイプIコラーゲンゲルに播種された。以下に記載された研究はコラーゲンゲルに一度播種された特異的な細胞の型を同定するためにDiI標識乳頭細胞およびDiO標識細網細胞を使用して行われた。

図4で示されるように、ゲル収縮の最初の速度は図3で示されるものとは異なっていたが、何故ならこれらのゲルは細胞数の半分を含んでいたためであった。しかし、乳頭および細網真皮細胞は異なった速度でゲルを収縮するそれぞれの能力を保持していた。DiIあるいはDiOでの標識化はゲル収縮に干渉しなかった。無作為に混合した乳頭および細網真皮細胞を含む

ゲルは乳頭および細網細胞だけのものの中間の速度でゲルを収縮した。層化ゲルのデータが他のゲルのそれと比較され、95%密集の水準で統計的に有意であることが発見された。乳頭および細網細胞を含む二重層ゲルは細網細胞のみを含んだゲルがなしたのと同じ速度で収縮した。更にこれらのゲルは単一存在物として収縮し、これは二層の融合を示している。

収縮の研究に続き、ゲルは固定され凍結切片は組織試験のために切断された。ゲルのいくらかは5週まで培養内に留まった。DiI標識乳頭真皮細胞およびDiI標識細網細胞を含む2週間培養された収縮ゲルの例はそれぞれ図5Aおよび

5 B で示される。両方の場合で細胞は細胞カプセルを形成するためにこれらのゲルの表面に移動した。しかしより少ない D i O 標識細胞がゲル表面に移動する (図 6) 。乳頭 (D i I - 標識) および細網 (D i O - 標識) 真皮細胞の無作為混合母集団で播種されたこれらのゲルはこの無作為組織を少なくとも 5 週間保持した。しかしこれらのゲルの表面に移動した細胞の非常に少ない 1 0 % 以下のものは細網真皮細胞であった。層化ゲルは単一ゲルを形成するために融合した。乳頭細胞および少ない範囲ではあるが細網細胞のゲル表面への移動が観察されたけれどもこれらの細胞の付着層への移動はなかった (図 7) 。

議論

成人皮膚の真皮は 2 種の異なったまた機能層つまり乳頭および細網真皮を含み、そのそれぞれは内在的に異なった細胞母集団を含む (6 5 、 6 6) 。乳頭真皮細胞は真皮の上部を占め上に重なる表皮の支持と栄養を提供し、一方下部の細網細胞はよ

り深部の真皮に特徴的な広範なコラーゲン性基質を精緻化する (6 2) 。乳頭あるいは細網真皮細胞いずれかの高度に富化された母集団を得るための技術が存在する (6 5 、 6 6) 。試験管内研究は、乳頭および細網真皮細胞が単層培養における彼等の形態構造、成長運動、およびタイプ I コラーゲンゲルを収縮する能力で異なることを示す (6 5 、 6 6) 。

ここで提示されるデータは、ヒト真皮細胞を生体染料で差別的に標識することができ、タイプ I コラーゲンゲルに一度標識され包埋されると、そのような細胞は 5 週の期間にわたり検出されるこれらの染料の十分な量を保持することを示している。これらの染料、とりわけ D i I は二つの重大な多成分および高度に調整された細胞機能、すなわち細胞増殖およびタイプ I コラーゲンゲルの収縮を実行するヒト真皮細胞の能力を損わなかった。増殖したゲルを収縮する乳頭および細網真皮細胞の固有の差異は影響されなかったし、それはこれらの細胞が基本的な生理学的特性を保持したことを示す。前もって標識された乳頭および細網真皮細胞を用いて、真の二重層ゲルが創り出されたことを示すことが可能となった。組織学的分析は、ゲルの 2 個の半分が融合されたことを示し、これら二重層ゲル

が単一存在物として収縮されたという事実により確認された。ゲルの2個の半分が融合したけれども、異なった細胞型の混ぜ合せは起こらなかった。

実施例 5

深い創傷での組織再生のためのMSC。

二つの型の処方がここで記載される。最初のものはヒトケラ

チノサイト層と共にMSC誘導真皮線維芽細胞の1個もしくはそれ以上の層を利用する多層皮膚等価物である。第2は、注射可能処方のもので、例えば下部細網層を再生するために皮膚等価物あるいは他の移植片の下にある深い創傷に適用されるMSCのゆるいコラーゲンゲル懸濁液である。

最初のものは現在の線維芽細胞の科学技術よりもケラチノサイトの成長を支持するより複雑な多重真皮層を提供することにより現在の皮膚等価物を改良する。単一線維芽供給層より優る真皮層の有利性は細網層に対する改良された血管侵入の可能性であり、一方同時にケラチノサイト増殖を高める乳頭細胞の優れた層を持つことである。完全に成熟した真皮線維芽細胞よりも初期始原細胞(MSC)が利用できることは患者へのより急速な取り込みを提供する。

MSC誘導真皮細胞は浸水コラーゲンゲルで成長しケラチノサイトで同時培養される。処方で変化する主要なパラメーターはコラーゲンの型、濃度、MSCをゲルに投与する的確なタイミング、MSCがゲルに置かれる時のMSCの分化の状態およびケラチノサイト培養の配置のタイミングである。最後に表皮の角質化を開始するため、空気水インターフェイスに同時培養物を持ち上げることも変更することが可能である。これらの変数は無胸腺マウスの創傷内で生体内研究のための実行処方を創り出すために最適化される。皮膚移植片は対照として前もっての分化なしでコラーゲンゲル内でMSCを補充したものと並べて試験される。

多層移植片は次いで試験管内実験がMSCを細網真皮細胞対

乳頭真皮細胞に向けて動かすことを明らかにするように実験で使用される。この前記の処方は2個のコラーゲンゲル、つまりMSCを播種され細網真皮細胞に

向けての分化を可能にするゲル、および別にMSCを播種され乳頭真皮細胞を活性化する条件で保温されるも一つのゲルよりなる。2個のゲルは培養で一緒に融合され移植の前に差別的に収縮することができる。層の厚みは最適化される。

他の徴候のために既に使用されているMSCの注射可能処方収縮は調製の際に、コラーゲンおよび細胞の濃度を変更することでゆるやかなコラーゲン懸濁液を提供する。

引用文献

1. パレントー、N. L.、ノルト、C. M.、ビルボ、P.、ローゼンバーグ、M.、ウिल्キンズ、L. M.、ジョンソン、E. M.、ワトソン、S.、メーソン、V. S.、ベル、E. 試験管内生成表皮：実践的考察および適用。細胞生化学ジャーナル45：245-251、1991。
2. ホルブルック、K. A. 発育中のヒト皮膚の構造と機能。皮膚の生理学、生化学、および分子生物学、第2版（LAゴールドスミス編）所収。オクスフォード・ユニバーシティ・プレス、オクスフォード、1991、63-110ページ。
3. バイロイター、K.、ローデマン、H. P.、フランク、P. I.、マイアー、K. 線維芽細胞の分化 stem cells. 細胞科学ジャーナル10（補遺）：115-130、1988。
4. フレミング、J. E. ジュニア、ヘインズワース、S. E.、ベイバー、M. A.、キャプラン、A. I. ヒト皮膚における間葉幹細胞エピトープ。準備中、1996。
5. キャプラン、A. I. 間葉幹細胞、整形外科研究ジャーナル、9：641-650、1991。
6. ヘインズワース、S. E.、ベイバー、M. A.、キャプラン、A. I. ヒト骨髄誘導間葉細胞の細胞表面抗原はモノクローナル抗体で検出される。骨13：69-80、1992。
7. ホルブルック、K. A.、南、S. A. ヒトにおける毛包胚形成：生体内試

験管内事象の特徴付け。ニューヨーク科学アカデミー年報、642:167-196、1991。

8. コナリー、T.、ブルーダー、S.、ケリガン、L. デキサメタゾン は多能性間葉始原細胞内でタイプ I BMP レセプターの発現を誘導する。移植整形外科研究学会、21:180、1996。

9. ラインバルド、J. G.、グリーン、H. ヒト表皮ケラチノサイトの連続培養：単一細胞からの角質化コロニーの形成。細胞6:331、1975。

10. ハンスブロー、J. F.、モーガン、J.、グリーンリット、G.、パリク、M.、ノルト、C.、ウイルキンズ、L. 無胸腺マウスの全層創傷における移植皮膚複合移植片の評価。創傷介護およびリハビリテーションジャーナル15:346-353、1994。

11. ラザラス、H. M.、ヘインズワース、S. E.、ガーソン、S. L.、ローゼンタール、N. S.、キャプラン、A. I. ヒト骨髄誘導間質始原細胞（間葉始原細胞）の生体外拡張および続く注入：治療用途の意味。骨髄移植16:557-564、1995。

12. 有賀、T. およびユー、R. K. (1987)、神経障害患者における Ig M タンパク質と反応する糖脂質を含む硫化グルクロン酸の特徴付け。生物学化学ジャーナル262:2、848-853。

13. プレスナック、A. S. (1978)、ヒトの真皮細胞

の発育および分化。皮膚研究ジャーナル71:208。

14. ブリッガマン、R. A. およびフィーラー、C. E. (1971)。成人ヒト皮膚における表皮真皮相互作用。皮膚研究ジャーナル56(1):18-26。

15. ブライトン、C. T. およびウッドベリ11、R. A. (1992)。可能な骨芽始原細胞としての血管周囲細胞。臨床整形外科。275:287-298。

16. キャプラン、A. I. (1991)、間葉幹細胞、整形外科研究ジャーナル9:641-650。

17. チュー、D. K. およびジャンガルバルF. B. (1986) HNK-1 抗体および神経障害でのある種のIgMパラプロテインと反応する神経系での硫酸グルクロン酸糖脂質の構造、生物学化学ジャーナル261:25、11717-11725。

18. コフィン、J. D. およびプール、T. J. (1991)。胚心臓および頭蓋血管発育における内皮細胞源および移行。解剖記録231:383-395。

19. ギルクレスト、B. A. およびイヤー、M. (1990) 皮膚老化の細胞および分子メカニズム。腫瘍手術皮膚ジャーナル16(10):915-922。

20. ホール、P. A. およびワット、F. M. (1989) 幹細胞:細胞多様性の創出および保持。発育106:619-633。

21. ヘインズワース、S. E.、ベイバー、M. A. およびキャプラン、A. I. (1992)。ヒト骨髓誘導細胞

上の細胞表面抗原はモノクローナル抗体で検出される。骨13:69-80。

22. ヘインズワース、S. E.、五島、J.、ゴールドバーグ、V. M. およびキャプラン、A. I. (1992)。ヒト骨髓からの骨形成能を持つ細胞の特徴付け、骨13:81-88。

23. ホルブルック、K. A. 発育するヒト皮膚の構造と機能。皮膚の生化学および生理学第2版、第2章に所収。L. A. ゴールドスミス編、オクスフォード・ユニバーシティ・プレス、ニューヨーク、ニューヨーク、1991。

24. ホルブルック、K. A. (1979) ヒト表皮胚形成。皮膚科学インターナショナルジャーナル、18巻、No. 5、329-356。

25. ホルブルック、K. A. およびホッフ、B. A. (1984)。発育中のヒト胚および胎児皮膚。皮膚科学セミナー3:3、185-201。

26. ホルブルック、K. A. およびスミス、L. T. (1981)。生命の胚、胎児、生後および成人時期のヒト皮膚の超微細構造外観。皮膚の形態形成および奇形。R. J. ブランドー(編)。アラン・リス、ニューヨーク、9-38。

27. ホルブルック、K. A. (1989) ヒト胚および胎児皮膚の個体発生における発育の標識構造。固有皮膚疾病の出生前診断の意味。皮膚発育老化および修復。G. アバタンジェロおよびJ. M. ダビッドソン(編)。フィディア

研究シリーズ、18巻、リビアナ・プレス・パドバ、245-262ページ。

28. ホルブルック、K. A. および南、S. I. (1991) ヒトにおける毛包胚形成。毛髪分子および構造生物学、642巻、ニューヨーク科学アカデミー年報、167-195。

29. イリアス、A. A. およびカールズ、R. H. (1986) 神経障害でのIgMパラプロテインを含む抗ミエリン関連糖タンパク質モノクローナル抗体と反応する硫化グルクロン酸糖脂質：エピトープの種分配および部分特徴付け。脳研究385：1-9。

30. ジョンソン、C. L. およびホルブルック、K. A. (1989)、ヒト胚および胎児真皮血管系の発育。皮膚科学研究ジャーナル93：1 OS-17S。

31. クラグスブラン、M. (1991) 血管形成の調節体。

生理学年次報告53：217-239。

32. カーバン、R. S. およびバーワン、J. (1990)。老化に伴う皮膚の組織学的変化。腫瘍手術と皮膚科学ジャーナル16(10)：908-914。

33. ラピエール、C. M. およびコリージュ、A. (1990)。年齢の異なるドナーの皮膚線維芽細胞成長因子への応答は細胞外基質で調節される。細胞生理学ジャーナル145：450-457。

34. ラブカー、R. M. およびドン、G. (1986)。老化皮膚の形態構造。皮膚科学クリニック4(3)：379

-389。

35. スミス、L. T. およびホルブルック、K. A. (1982) 発育中の成人における真皮基質の構造。皮膚科学研究ジャーナル79：93-104。

36. スミス、L. T. およびホルブルック、K. A. (1986) ヒト皮膚における真皮の胚形成。小児科皮膚科学3(4): 271-280。
37. リプトン、B. H. およびカラセク、M. A. (1990) 微細血管内皮細胞交換分化: 表現型特徴付け。分化46: 117-133。
38. モロハンフォラ、ケヒンドA. (1992)。皮膚およびその付属体の分化、乳頭隆起の正常発育。解剖記録232: 4-587。
39. ネールズ、V. およびドレンクハーン、D. (1993) 微血管周囲細胞の多様性: 間葉から平滑筋まで? 組織化学99: 1-12。
40. オーエン、M. S. (1985)。骨形成細胞の系列および間質系との関係。骨および無機質研究。W. A. ペック編、3巻1ページ所収。
41. ノーデン、D. M. (1990) トリ胚血管の源および構築。欠損性心臓発育の胚源、ニューヨーク科学アカデミー年報、588巻。
42. オドランド、G. F. 皮膚の構造。皮膚の生化学および生理学、第1章所収。第2版、L. A. ゴールドスミス編。オクスフォード・ユニバーシティ・プレス、ニューヨーク、1991。
43. センゲル、P. 皮膚および皮下付属体形成中の表皮-真皮相互作用。皮膚の生化学および生理学、第3章所収。L. A. ゴールドスミス編。オクスフォード・ユニバーシティ・プレス、ニューヨーク、ニューヨーク、1991。
44. スミス、L. T. およびホルブルック、K. A. (1986) ヒト皮膚における真皮の胚形成。小児科皮膚科学3: 4、271-280。
45. スミス、L. T. およびホルブルック、K. A. (1982)。ヒト胚および胎児皮膚における真皮結合組織の発育。電子顕微鏡走査4: 1745-1751。
46. スター、M. M. (1990)。モノクローナル抗体で定義されるイヌケラチノサイトの細胞表面抗原の差別的発現。組織化学および細胞化学ジャーナル38: 4、541-549。
47. トネセン、M. G. およびクラーク、A. F. (1985)。ヒト皮下微

小血管系発育中のフィブロネクチン、ラミニン、および因子VIII関連抗原の発現。
。

48. ボロス、E. およびロバート、A. M. (1990) ヒト皮膚表面の年齢
関連変化。老年学36:276-285。

49. ベッセルズ、N. K. (1965) 初期羽発育中の形態構造および増殖。
発展生物学12:131-153。

50. ヴィレン、M. D. およびキャプラン、A. I. (1991) 老化の間ヒ
ト皮膚におけるグリコサミノグリカン-

プロテオグリカン免疫染色のパターン。皮膚科学研究ジャーナル96 6:96
8-974。

51. ウェストゲート、G. E. およびカウチマン、J. R. (1984) 毛包
形態形成中の基礎膜成分の免疫組織化学局在化。皮膚科学研究ジャーナル94:
259-264。

52. ジャホーダ、C. およびオリバー、R. F. (1984)、培養真皮乳頭
細胞移植による毛髪成長の導入。ネイチャー311:560-562。

53. ワインバーグ、W. C. およびリヒティ、U. (1993)。生体内毛包
発育の再構築:小胞形成の決定、毛髪成長、および真皮細胞による毛髪の品質。
皮膚科学研究ジャーナル100:229-236。

54. キャバロ、T. (1973) 腫瘍血管形成における初期血管増殖応答の超
微細構造オートラジオグラフ研究。病理学アメリカンジャーナル70:345-
362。

55. ブルーダー、S. およびキャプラン、A. I. (1989)。胚ひな脛骨
の骨形成系列の最初の骨形成および切開は骨芽細胞に対するモノクローナル抗体
により明らかにされる。10:359-375。

56. ベル、E. 、エーリッヒ、H. P. 、バトル、D. 、中辻、T. 。試験管
内で形成され全層の皮膚等価物組織として受け入れられた生体組織。サイエンス
、211、1052、1981。

57. ベル、E. 、シャー、S. 、ハル、B. 、メリル、C. 、ローゼン、S.

、チャムソン、A.、アセリノー、

D.、ダバート、L.、クーロン、R.、ラピエール、C.、ナスゲン、B. およびネボー、Y. 生体皮膚の再構成。皮膚科学研究ジャーナル、81、25、1983。

58. アレン、T. D. およびスカー、S. L. 真皮線維芽細胞によるコラーゲン基質の収縮。超音波研究ジャーナル83、205、1983。

59. クーロン、B.、ダバートレット、L.、ベル、E. およびトゥーレン、R. コラーゲン格子構造での線維芽細胞の収縮性はコルチコステロイドで減少される。皮膚科学研究ジャーナル82、341、1984。

60. トゥアン、T. L.、ケラー、L. C.、サン、D.、ニヌイ、M. E. およびチェン、D. 真皮線維芽細胞はコラーゲングルでケラチノサイト成長を活性化する。細胞科学ジャーナル、107、2285、1994。

61. ブラウン、L. J.、ギーシン、J. C.、ロスネイジェル、J. A.、ループ、D. R.、およびゴードン、J. S. 液体空気インターフェイスで培養された再構築ヒト皮膚でロリクリン発現のレチノール酸抑制。皮膚科学研究ジャーナル102、886、1994。

62. ステン、K. S. 皮膚。ワイス、L. 編。組織学、細胞および組織生物学、5版、所収。ニューヨーク、エルスビア・バイオメディカル、569ページ。

63. レイノルズ、A. J.、オリバー、R. F. およびジャホーダ、C. A. B. 真皮細胞母集団は表皮細胞支持で変化に富む能力を示す：毛乳頭細胞の刺激効果。細胞科学

ジャーナル、98、75、1991。

64. リマット、A.、フンツィーカー、T.、ヴェルティ、E. R.、イネーブニット、S. P.、ヴァイスマン、U. およびブラーテン、L. R. ヒト毛乳頭細胞および真皮線維芽細胞からの可溶因子は外側毛根鞘細胞のクローナル成長を劇的に増加させる。Arch. 皮膚科学、285、205、1993。

65. ハーパー、R. A. およびグローブ、G. 乳頭および細網真皮から誘導さ

れるヒト皮膚線維芽細胞：試験管内成長能の差異。サイエンス204、526、1979。

66. シェーファー、I. A.、パンディ、M.、ファーガソン、R. およびデビス、B. R. 幼児および成人の乳頭および細網真皮から誘導される線維芽細胞の比較観察：成長運動、密集での固まる密度および表面形態構造。老化進展のメカニズム。31、275、1985。

67. アンダジャ、M. B.、メリン、M.、ゲレット、S.、およびグリモード、J. A. 細胞移動はコラーゲングル収縮に影響する。極微小細胞学病理学ジャーナル24、145、1992。

68. ホーニッグ、M. G. およびヒューム、R. I. Di I および Di O：神経標識および経路トレーシングのための変化に富む蛍光染料。神経科学潮流12、333、1989。

69. ベスターグレンートルソン、G.、オネルビーク、P. O.、フランソン、L. A.、およびメームストローム、

A. 培養線維芽細胞の増殖はL-イズロン酸塩含有グリコサミノグリカンにより阻害される。細胞生物学ジャーナル、147、523、1991。

70. レノン、D. P.、ヘインズワース、S. E.、ヤング、R. G.、デニス、J. E. およびキャプラン、A. I. 合成培地はラット骨髄誘導間葉幹細胞の骨軟骨能の試験管内増殖を支持し維持する。細胞実験研究、219、211、1995。

71. フォン・バルテルド、C. S.、カニンガム、D. E. およびルーベル、E. W. Di I による神経トレーシング：光学および電子顕微鏡写真分析のための脱石灰化、凍結切開および光転化。

72. ジョンソン、G. D.、ダビッドソン、R. S.、マクネーミー、K. C.、ラッセル、G.、グッドウィン、D. およびホルボロー、E. J. 顕微鏡撮影中の免疫蛍光のフェーディング：現象およびその改善法の研究。免疫学および方法ジャーナル55、231、1982。

73. 河野、T.、谷、T.、古川、M.、水野、N.、北島、J.、石井、M.

、浜田、T. および吉里、K. タイプ I コラーゲン格子で培養あるいは水和されたヒト真皮線維芽細胞の細胞循環分析。Arch. 皮膚科学研究 282、258、1990。

74. グリネル、F. および中川、S. 線維芽細胞増殖の空間調節：創傷修復の終期の細胞退化の説明。進行性臨床生物学研究 365、155、1991。

75. 西山、T.、常永、M.、中山、Y.、足立、E. および林、T. ヒト線維芽細胞の成長速度は基質の培養物ではなく再構築コラーゲン基質内の培養物により抑制される。基質 9、193、1989。

76. セルベージャー、G. N.、フレーザー、S. E. およびブローナー、M. 生体染色標識で明らかにされるマウス胚での体幹神経稜細胞移動の経路。発育、108、605、1990。

77. ステム、C. ひよこ胚の胚盤葉下層および原始線条に対する周辺帯およびその貢献。発育、109、667、1990。

78. レドレー、F. D.、ソリアーノ、H. E.、オマリー、B. W.、ルイス、D.、ダーリントン、G. J. およびファインゴールド、M. 固体器官への細胞移植の標識としての DiI。バイオテクニク、13、580、1992。

79. ホーン、K. A.、ジャホーダ、C. A. B. およびオリバー、R. F. 成長ラットの培養触毛真皮乳頭細胞の移植で誘導されるひげの成長。発生学および実験形態学ジャーナル、97、111、1986。

80. ワインバーグ、W. C.、グードマン、L. V.、ジョージ、C.、モーガン、D. L.、レッドベター、S.、ヤスパ、S. H. およびリヒティ、U. 生体内毛包発育の再構築：真皮細胞による小胞形成、毛髪成長、および毛髪品質の決定。皮膚科学研究ジャーナル、100、

229、1993。

81. イエーガー、P. C.、スタイルズ、C. D. およびロリンズ、B. J. 線維芽細胞表面でのヒトケラチノサイト成長促進活性。細胞生理学ジャーナル、149、110、1991。

【 図 1 】

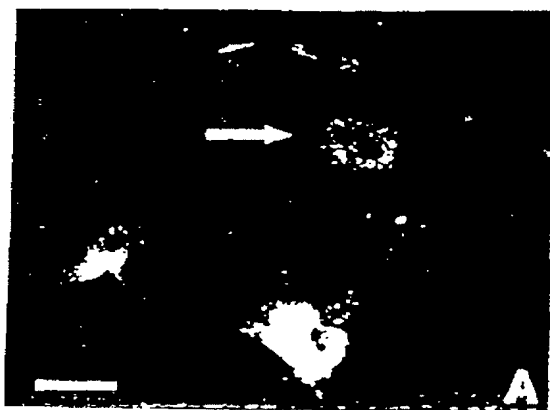


Figure 1A



Figure 1B

Figure 1

【 図 5 】



Figure 5A

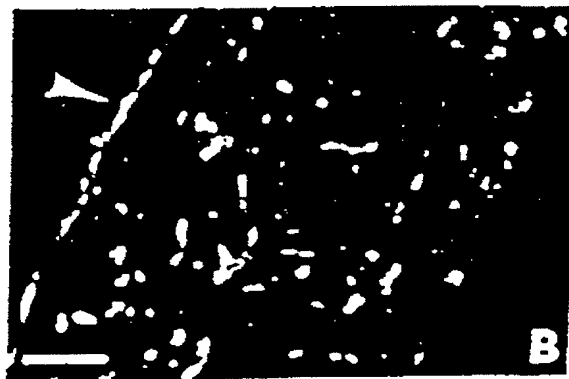


Figure 5B

Figure 5

【 図 2 】

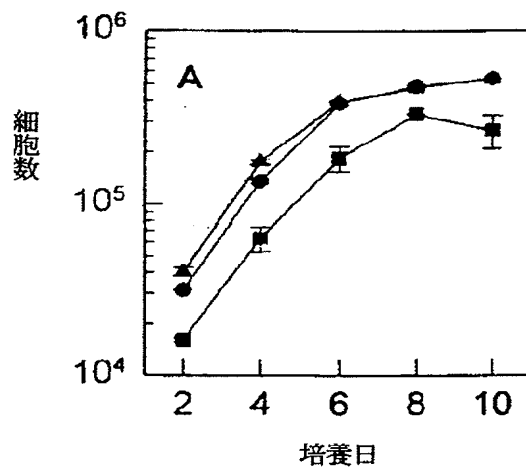


Figure 2A

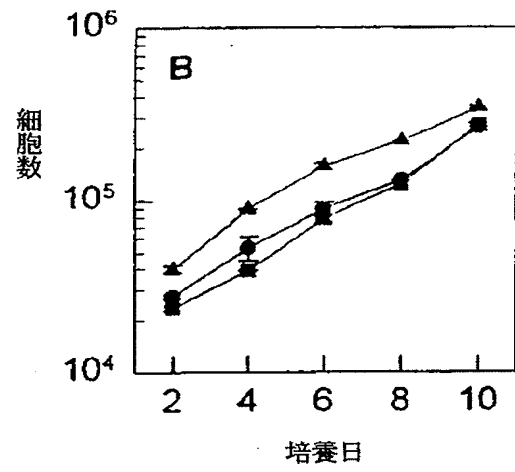


Figure 2B

Figure 2

【 図 3 】

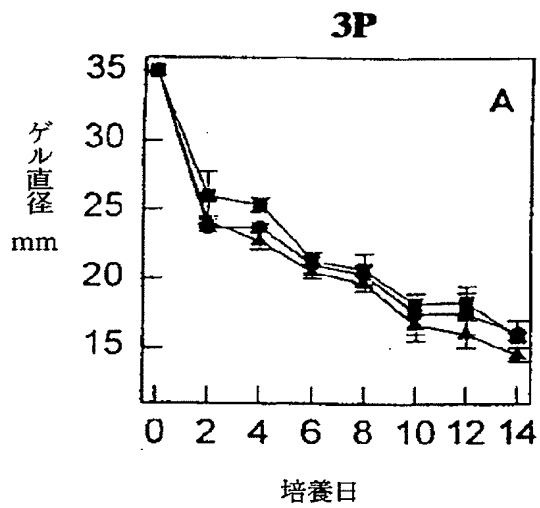


Figure 3A

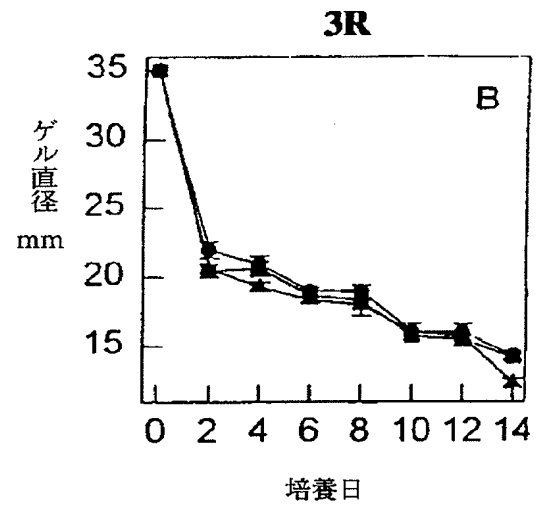


Figure 3B

Figure 3

【 図 4 】

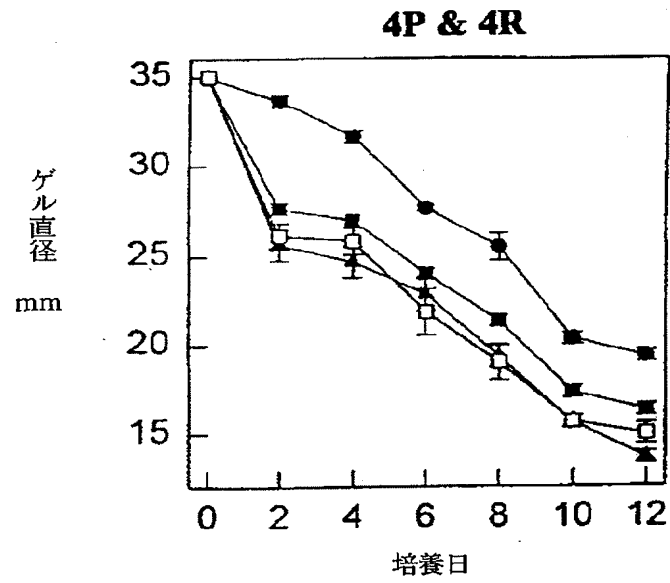


Figure 4

【 図 6 】

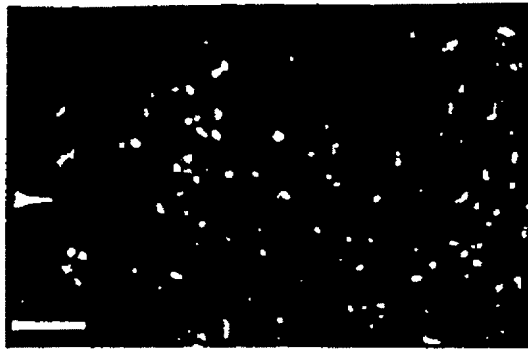


Figure 6

【 図 7 】

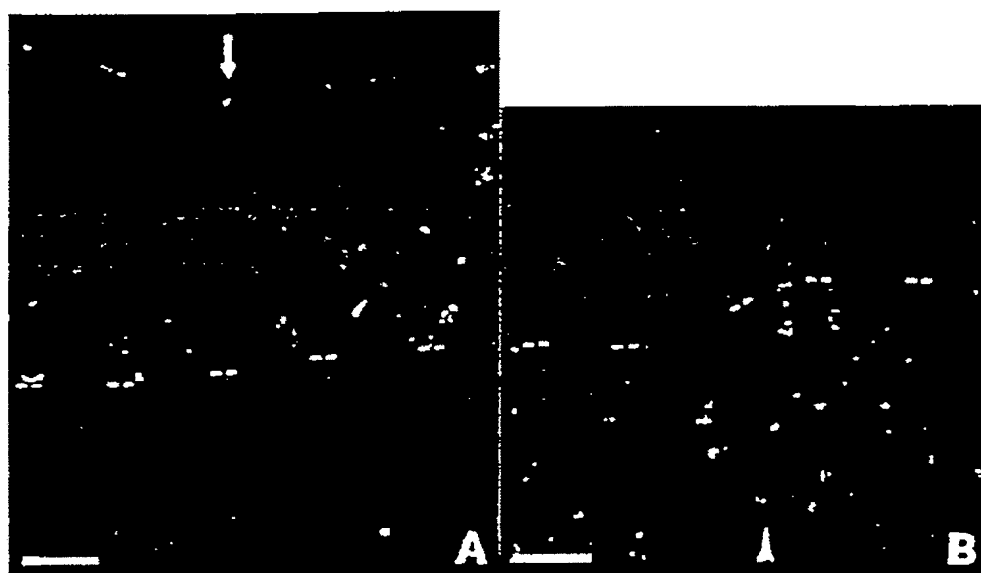


Figure 7A

Figure 7B

Figure 7

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US97/06760

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(6) : C12N 5/00, 11/00, 11/02; A61F 2/10 US CL : 424/93.7; 435/174, 177, 325, 395; 623/15 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/93.7; 435/174, 177, 325, 395; 623/15 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS search terms: skin equivalent, keratinocytes, mesenchymal stem cells, scaffold, fibroblasts, extracellular matrix		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 4,505,266 A (YANNAS et al) 19 March 1985, entire document.	1-52
Y	US 5,354,736 A (BHATNAGAR) 11 October 1994, col. 13, lines 50-60.	43-52
Y	KREJCI et al, In Vitro Reconstitution of Skin: Fibroblasts Facilitate Keratinocyte Growth and Differentiation on Acellular Reticular Dermis. The Journal of Investigative Dermatology, 1991, Vol 97, pages 843-848, entire document.	1-52
Y	LIVESEY et al, Transplanted Acellular Allograft Dermal Matrix. Transplantation, 15 July 1995, Vol. 60, No. 1, pages 1-9, entire document.	1-52
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
01 AUGUST 1997		03 SEP 1997
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer DAVID M. HAFER Telephone No. (703) 305-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet)(July 1992)*